

***Qualitative und quantitative Speziesanalytik  
mittels simultaner EI-MS und ICP-MS Detektion  
nach gaschromatographischer Trennung***

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

von

Jan Kösters  
geboren in Bocholt

Schmallenberg, April 2006



# Inhaltsübersicht

<i>Inhaltsverzeichnis.....</i>	<i>I</i>
<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>III</i>
<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>VI</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis.....</i>	<i>VII</i>
<i>Nomenklatur metall(oid)organischer Verbindungen.....</i>	<i>VIII</i>
<i>1. Einleitung.....</i>	<i>1</i>
<i>2. Theoretischer Teil.....</i>	<i>3</i>
<i>3. Analytischer Teil.....</i>	<i>40</i>
<i>4. Anwendbarkeit und Potential der Methode.....</i>	<i>78</i>
<i>5. Ausblick.....</i>	<i>124</i>
<i>6. Zusammenfassung.....</i>	<i>126</i>
<i>7. Literaturverzeichnis.....</i>	<i>130</i>
<i>8. Anhang.....</i>	<i>136</i>
<i>Danksagung.....</i>	<i>148</i>
<i>Erklärung.....</i>	<i>150</i>
<i>Publikationsliste:.....</i>	<i>152</i>
<i>Lebenslauf.....</i>	<i>154</i>



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Teil.....</b>	<b>3</b>
2.1 Umweltrelevanz und Toxizität metall(oid)organischer Verbindungen.....	3
2.1.1 Quecksilber.....	4
2.1.2 Zinn.....	6
2.1.3 Arsen .....	7
2.1.4 Antimon.....	9
2.1.5 Bismut.....	10
2.1.6 Selen.....	11
2.2 Instrumentelle Techniken zur Elementspeziation.....	13
2.2.1 Gaschromatographie (GC).....	14
2.2.2 Induktiv gekoppeltes Plasma mit massenspektrometrischer Detektion (ICP-MS).....	20
2.2.3 Elektronenstossionisierung mit massenspektrometrischer Detektion (EI-MS).....	21
2.3 Einsatz von GC, ICP-MS und EI-MS in der Elementspeziation.....	34
2.3.1 Vor- und Nachteile gegenüber alternativen Techniken.....	34
2.3.2 Stand der Forschung.....	36
2.3.3 Motivation und Ziel der Arbeit .....	39
<b>3 Analytischer Teil .....</b>	<b>41</b>
3.1 Experimentelles.....	41
3.2 Entwicklung der GC/ICP-MS/EI-MS Gerätekopplung.....	43
3.2.1 Vorüberlegungen und Geräteauswahl.....	43
3.2.2 Konstruktive Umsetzung und Aufbau der Kopplung.....	48
3.2.3 Bewertung analytischer und chromatographischer Parameter.....	54
3.3 Entwicklung eines variablen Probenaufgabesystems.....	65
3.3.1 Konzeptionelle Überlegungen .....	65
3.3.2 Aufbau und Funktionsprinzip des automatisierten Kaltaufgabesystems .....	66
3.3.3 Beurteilung des automatisierten Purge & Trap Systems.....	71
<b>4 Anwendbarkeit und Potential der Methode.....</b>	<b>79</b>
4.1 Identifizierung und Verifizierung von Stoffwechselprodukten in mikrobiologischen Prozessen.....	80
4.2 Untersuchungen zur Metabolisierung von Bismut im menschlichen Körper.....	91
4.3 Quantitativ und qualitativ validierte Quecksilberspezierung in Humanblut .....	97
4.4 Überprüfung und Verifizierung von Derivatisierungsprodukten nach Hydridgenerierung.....	106

4.5 Identifizierung von Reaktionsprodukten bei der Untersuchung von Zerfallmechanismen metall (oid)organischer Verbindungen.....	117
<b>5 Ausblick.....</b>	<b>125</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>127</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>131</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>137</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: A) Beispiele für einige Arsenzucker mit unterschiedlichen Resten. B) Strukturformel für Arsenobetain.....	8
Abbildung 2.2: Abhängigkeit des Partialdrucks einer gelösten Komponente von deren Konzentration in der Lösung.....	14
Abbildung 2.3: Die allg. Van Deemter-Kurve (1 Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung, 2 Längs- diffusion, 3 Stoffaustausch, 4 resultierende van Deemter-Kurve $H(u)$ ).....	19
Abbildung 2.4: Elektronenübergänge bei der Ionisierung a) vertikal (Frank-Condon-Übergang) b) adiabatisch (0,0-Übergang) (modifiziert aus [Budzikiewicz und Schäfer 2005]).....	23
Abbildung 2.5: Schema einer EI-Ionenquelle. Der neutrale Molekülstrahl tritt senkrecht zur Papierebene in die Quelle ein [Schröder 1991].....	28
Abbildung 2.6: schematische Darstellung einer Quadrupol Ionenfalle (Ion-Trap) nach dem Vorbild der Paul-Falle.....	30
Abbildung 3.1: Skizzen der getesteten Splits (nicht maßstabsgetreu). ....	47
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Transferleitung zum ICP-MS (nicht maßstabsgetreu modifiziert aus [Kösters et al. 2005]).....	48
Abbildung 3.3: Lineare Kalibrationen der Iodalkane in doppellogarithmischer Auftragung. ....	56
Abbildung 3.4: ICP-MS Chromatogramm der untersuchten Iodalkane anhand der Massenspur $m/z$ 127. 61,6 Sek : Iodmethan, 73,9 Sek Iodethan, 84,3 Sek: 2-Iodpropan, 93,5 Sek: 1-Iod- propan. Injizierte Mengen s. Tab. 3.11.....	60
Abbildung 3.5: EI-MS Chromatogramm von 2-Iodpropan (83,22 Sek) und 1-Iodpropan (92,34 Sek) über den Molekülpeak $m/z$ 170. ....	61
Abbildung 3.6: Schematische Skizze des automatisierten Kaltaufgabesystems. T1: Kühlfalle 1, T2: Kühlfalle 2, V1: Ventil 1, V2: Ventil 2, TCD: Wärmeleitfähigkeitsdetektor, EPC: elektron. Druckkontrolle, PTV: Temperaturgesteuerte Verdampfung.....	64
Abbildung 3.7: Flusswege bei den unterschiedlichen Ventilstellungen. Erkl. der Abk. s. Abb. 3.6 S. 64.....	68
Abbildung 3.8: Vergleich der auf die aufzugebene Iodmenge normierten Peakflächen und der jeweiligen Mittelwerte als Empfindlichkeitsmaß für die Flüssiginjektion und die Purge & Trap Aufgabe.....	75
Abbildung 4.1: a) EI-MS-Chromatogramm des ethylierten Zellfreiextraktes von <i>M. formicicum</i> nach P & T Aufgabe (Darstellung m. Enhanced Data Analysis d. MSD ChemStation) sowie Massenspektren von b) MEDMBi, c) DEMMBi und d) TEBi .....	81
Abbildung 4.2: ICP-MS Chromatogramm der Messung des Gasraums über ASI-1 nach Inkubation mit $\text{SeO}_2$ .....	82

Abbildung 4.3: EI-MS Spektrum und Vergleichspektrum aus der Bibliothek von A) Dimethylselen und B) Dimethyldiselen nach Purge & Trap Messung des Gasraums ASI-1.....	83
Abbildung 4.4: Vergrößerter Ausschnitt aus dem in Abbildung 4.2 gezeigten Chromatogramms mit paralleler Darstellung der Massenspuren m/z 78 und 82. ....	84
Abbildung 4.5: ICP-MS Chromatogramm für die Massenspuren m/z 77 und 82 aus der Messung des Gasraums von <i>Methanoplanus limicola</i> .....	85
Abbildung 4.6: <sup>209</sup> Bi Signale (ICP-MS Detektion) nach Etylierung und P & T Aufgabe der Blutproben eines Probanden von unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Einnahme von Bismut(III)citrat.....	91
Abbildung 4.7: ICP-MS Chromatogramm von <sup>202</sup> Hg nach Etylierung der Probe J.P. 15 .....	98
Abbildung 4.8: Massenspektrum aus dem EI-MS Chromatogramm der Probe J.P. 15 bei 14,6 Min .....	98
Abbildung 4.9: ICP-MS Chromatogramm von <sup>202</sup> Hg nach Etylierung einer Standardlösung (50 ng MMHgCl absolut) mit Ausschnittsvergrößerung.....	99
Abbildung 4.10: EI-Massenspektren nach Etylierung von 50 ng Methylquecksilberchlorid bei A) RT 11,41 Min (oben), Isotopenmuster von Hg <sub>0</sub> von einer in der Bibliothek befindlichen Quecksilberverbindung (Cobalt Quecksilberthiocyanat, unten) B) RT 12,28 Min (oben), Bibliotheksspektrum von Dimethylquecksilber (unten) C) RT 14,62 Min D) RT 17,66 Min (oben), Bibliotheksspektrum von Diethylquecksilber (unten) .....	100
Abbildung 4.11: Laborvergleich zur quantitativen Validierung der Ergebnisse der Untersuchung von Humanblut auf Monomethylethylquecksilber .....	101
Abbildung 4.12: ICP-MS Chromatogramm (Ausschnitt) der Masse 75 (Arsen) nach Hydrierung einer Bodenprobe (Bundeswehr Altlast) und P & T Aufgabe .....	108
Abbildung 4.13: ICP-MS Chromatogramm der Masse 121 (Antimon) nach Hydrierung einer Bodenprobe (Bundeswehr Altlast) und P & T Aufgabe .....	109
Abbildung 4.14: Massenspektren der in Abb. 4.13 S. 110 gezeigten Antimonspezies. Für die Zuordnung der Fragmentationen wurde das Antimonisotop 121 zugrunde gelegt.....	110
Abbildung 4.15: ICP-MS Chromatogramme nach Hydrierung (pH 5) und P & T Aufgabe: A) MMA (III) ausgeschnitten aus HPLC Lauf einer Urinprobe (20 µL) B) MMA(III) ausgeschnitten aus Multispeziesstandard (ca. 20 ng/mL As(III), MMA(III)), DMA(V), MMA(V), As(V)).....	111
Abbildung 4.16: ICP-MS Chromatogramme nach direkter Hydrierung (pH 5) und P & T Aufgabe A) 500 µL eines Einzelstandards (1,9 ng/mL MMA (III)) B) 500 µL eines Multispeziesstandard (ca. 20 ng/mL As(III), MMA(III)), DMA(V), MMA(V), As(V)).....	112
Abbildung 4.17: Reaktionskammer zur Untersuchung des radikalischen und photolytischen Abbaus von DMSe [pers. Mitt. Carsten Lomann].....	116



Abbildung 4.18: A) ICP-MS Chromatogramm für m/z 82 zur Untersuchung der gasförmigen Reaktionsprodukte des oxidativen und photolytischen Abbaus von Dimethylselen B) Ausschnittsvergrößerung.....	117
Abbildung 4.19: Identifizierte Selenspezies nach oxidativem und photolytischem Abbau mit Bibliotheksspektren.....	120
Abbildung 4.20: Zuordnung möglicher Fragmentionen des Ethenylmethylselen für das EI-Massenspektrum bei RT 6,86 Min.....	121
Abbildung 4.21: Zuordnung möglicher Fragmentionen des Ethenylmethyldiselen für das EI-Massenspektrum bei RT 11,83 Min.....	121
Abbildung 8.1: Massenspektren mit Vergleichsspektren aus der Bibliothek (Wiley 7n.1) von A) Monomethylarsin, B) Dimethylarsin C) Trimethylarsen, D) Dimethylchlorarsen, E) Trimethylantimon. ....	136
Abbildung 8.2: Massenspektren von A) Stanan, B) Monomethylzinnhydrid, C) Dimethylzinnhydrid, D) Monbutylzinnhydrid.....	136
Abbildung 8.3: Massenspektren von A) Diarsin, B) Methylarsin, C) Dimethylmethylthioarsen, D) Dimethyltellur.....	137
Abbildung 8.4: Für die Masse 89 bei RT 14,26 Min ( A ) und die Masse 137 bei RT 9,71 Min ( C ) wurde mit dem PolarisQ (Thermo Finigan) jeweils ein zweites Fragmentogramm erzeugt (MS2) ( B ) und D ) ).....	138
Abbildung 8.5: MS Spektrum von Trimethylantimon aus der Messung einer Kompostprobe mit dem PolarisQ (Thermo Finigan) .....	138
Abbildung 8.6: Massenspektren von A) TMBi, B) TMSb, C) DMSe mit Bibliotheksspektren sowie D) DMTe aus den Headspace Untersuchungen verschiedener Archaeenarten.....	139
Abbildung 8.7: Massen- und Bibliotheksspektren (head to tail) der untersuchten Iodalkane. ....	140
Abbildung 8.8: Massenspektrum und Datenbankvergleich für TMBi.....	141
Abbildung 8.9: Massenspektrum und Datenbankvergleich für TEBi.....	141
Abbildung 8.10: Massenspektren der in Abb. 4.12 (S.109) gezeigten Arsenspezies .....	142
Abbildung 8.11: EI-Massenspektren nicht zugeordneter Selenspezies nach Photolyse von Dimethylselen (Abb. 4.17 S. 117) bei RT 7,04 Min und 8,68 Min. ....	143
Abbildung 8.12: EI-Massenspektren nicht zugeordneter Selenspezies nach Photolyse von Dimethylselen (Abb. 4.17 S. 117) bei RT 8,91 Min und 9,79 Min.....	144
Abbildung 8.13: EI-Massenspektren nicht zugeordneter Selenspezies nach Photolyse von Dimethylselen (Abb. 4.17 S. 117) bei RT 10,26 Min und 13,66 Min.....	145
Abbildung 8.14: EI-Massenspektrum nicht zugeordneter Selenspezies nach Photolyse von Dimethylselen (Abb. 4.17 S. 117) bei RT 14,21 Min.....	146

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 3.1 Mit dem Quadrupol System MSD 5973N (Agilent Technologies) identifizierte Verbindungen.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 3.2: Mit dem Ion-Trap-System PolarisQ (Thermo Finnigan) identifizierte Verbindungen.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 3.3: Relative Peakhöhen sowie halbe Peakbreiten von Tetraethyl- (TeESn) und Tetrabutylzinn (TeBSn) zur Optimierung des Make up Flusses in der Transferleitung (über Aux4 ) zum ICP- MS.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 3.4: Betriebsparameter für EI-MS, ICP-MS und Transferleitungen.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 3.5: Zur Kalibration von EI-MS und ICP-MS injizierte Mengen an Iodalkanen und entsprechende relative Standardabweichungen (RSD) der Messungen.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 3.6: Analytische Daten ermittelt aus der Kalibration von EI-MS („scan“ Modus) und ICP-MS .....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 3.7: Retentionszeiten, Halbwertsbreiten und daraus berechnete Auflösung für 2-Iodpropan und 1- Iodpropan im Vergleich von ICP-MS und EI-MS Detektion.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 3.8: Vergleich der für EI-MS und ICP-MS detektierten Retentionszeiten.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 3.9: Berechnung des Verdampfungsverlustes beim Ansetzen der Verdünnung.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 3.10: Probenaufgabebedingungen sowie GC Parameter für den Vergleich von Purge &amp; Trap Aufgabe und direkter Flüssiginjektion der Iodalkane.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 3.11: Vergleich von Purge &amp; Trap Aufgabe und Flüssiginjektion (ICP-MS-Daten).....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 4.1: Nachgewiesene Elementspezies und deren Retentionszeiten im ICP-MS nach Headspace Untersuchungen zur Volatilisierung von Metall(oid)en durch verschiedene methanogene Archaea mittels GC/EI-MS/ICP-MS Kopplung. Bibliotheksspektren (BS) s. Abb. 8.6 S. 139 .....</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 4.2: Peakflächen der nach Ethylierung und P &amp; T Aufgabe in den Blutproben vor und nach der Einnahme von Bismut(III)citrat detektierten Bismutspezies und Gesamtgehalt an Bismut. ....</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 4.3: Ergebnisse der Vergleichsuntersuchung von Blutproben der Mitarbeiter eines Hg-Recyclingbetriebs auf Methylquecksilber [pers. Komm. J. Hippler].....</i>	<i>97</i>
<i>Tabelle 4.4: Zuordnung der Peaks, die nach Ethylierung der Standardlösung (s. Abb. 4.9) beobachtet wurden.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabelle 4.5: HPLC Parameter zur Trennung der Urinprobe.....</i>	<i>106</i>
<i>Tabelle 4.6: Zuordnung der Arsenspezies des in Abb. 4.12 gezeigten Chromatogramms. Massenspektren: s. Abb.8.10 (S. 142).....</i>	<i>108</i>
<i>Tabelle 4.7: Zuordnung der Antimonspezies des in Abb. 4.13 gezeigten Chromatogramms. Massenspektren: (s. Abb.4.14 S.110).....</i>	<i>109</i>
<i>Tabelle 4.8: Zuordnung der detektierten Selenspezies nach oxidativem und photolytischem Abbau.....</i>	<i>119</i>

## Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
AD	Außendurchmesser
AES	Atomemissionsspektrometrie
BG	Bestimmungsgrenze
BS	Bibliotheksspektrum (Vergleichsspektrum aus einer Datenbank)
bzw.	beziehungsweise
CC	Kollisionszelle (Collision Cell)
CI	Chemischen Ionisierung
EI	Elektronenstoß Ionisierung
EPC	Elektronische Druckkontrolle (Electronic Pressure Control)
ESI	Elektrospray Ionisierung
GC	Gaschromatographie oder Gaschromatograph
HF	Hochfrequenz
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HR	Hochauflösung (High Resolution)
Hrsg.	Herausgeber
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma (Inductively Coupled Plasma)
ID	Innendurchmesser
IE	Ionisierungsenergie
IP	Ionisierungspotenzial
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography)
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
MS	Massenspektrometrie oder Massenspektrometer
MSD	Massenselektiver Detektor
NWG	Nachweisgrenze
P & T	Purge & Trap
PDMS	Polydimethylsiloxan
PTV	Temperaturgesteuerte Verdampfung (Programmed Temperature Vaporisation)
RSD	Relative Standardabweichung (Relative Standard Deviation)
RT	Retentionszeit
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SIM	Einzel Ionen Aufzeichnung (Single Ion Monitoring)
TCD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (Temperature Conductivity Detector)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## Nomenklatur metall(oid)organischer Verbindungen

Als Kurzschreibweise wird für das Metall oder Metalloid das übliche Elementsymbol aus dem Periodensystem verwendet. (z.B. Zinn: Sn)

An das Element gebundene Kohlenwasserstoffreste werden mit dem Anfangsbuchstaben abgekürzt:

Methyl-:	M
Ethyl-:	E
Propyl-:	P
Butyl-:	B

Kommt es zu Doppeldeutigkeiten, wird der zweite Buchstabe hinzugenommen; z.B:

Pentyl-:	Pe
Phenyl-:	Ph

Die Anzahl mit der ein Kohlenwasserstoffrest in der Verbindung jeweils vorkommt wird durch den Anfangsbuchstaben des griechischen Zahlwortes abgekürzt:

Mono-:	M
Di-:	D
Tri-:	T

Auch hier wird im Falle einer Doppeldeutigkeit der zweite Buchstabe hinzugenommen; z.B.:

Tetra-:	Te
---------	----

Diese Nomenklatur wurde auch für andere Alkylverbindungen übernommen; z.B.:

Natriumtetraethylborat:	NaTeEB
-------------------------	--------

# 1 Einleitung

Die Notwendigkeit der speziesspezifischen Differenzierung bei der Bewertung des toxikologischen oder ökotoxikologischen Potentials eines Elementes ist heutzutage allgemein anerkannt.

So haben in der Vergangenheit tragische Vergiftungsfälle wie in Minamata oder erhebliche Beschädigungen ganzer Ökosysteme wie im Fall der Everglades dazu beigetragen, dass auch der Öffentlichkeit die hohe akute und chronische Toxizität organischer Quecksilberverbindungen bewusst wird.

Und auch die aktuelle Diskussion um das Vorhandensein möglicherweise toxischer dreiwertiger Arsenspezies als Zwischenprodukte im Metabolismus dieses Elementes (s.Kap. 2.1.3 S. 7) spiegelt die Erkenntnis wieder, dass die Bestimmung des reinen Elementgehaltes ohne Kenntnis der exakten chemischen Verbindung in dem jeweilig untersuchten System nicht ausreicht, um zielgerichtete Aussagen über Toxizität, Mobilität oder andere relevante Eigenschaften machen zu können.

Neben der Schwierigkeit, die verschiedenen chemischen Spezies eines Elementes in der zu untersuchenden Probenmatrix zu trennen und mit hinreichend empfindlichen Methoden zu quantifizieren, stellt sich in dieser als Elementspeziation bezeichneten Disziplin der Analytik sehr häufig das Problem der Identifikation beziehungsweise der Verifikation einer Verbindung.

Über deren systemspezifischen Verweilzeiten (Retentionszeiten) im Vergleich mit Standards oder in speziellen Fällen durch Korrelation der Siedepunkte mit diesen Retentionszeiten besteht für einige Substanzen die Möglichkeit der indirekten Zuordnung. Zur eindeutigen Verifikation der strukturellen Identität eines Analyten sind jedoch molekülspezifische Informationen unverzichtbar. Eine solche qualitative Absicherung durch die Einbindung strukturaufklärender Methoden minimiert darüber hinaus die Gefahr der Fehlinterpretation, die ansonsten durch die mögliche Überschneidung der Retentionszeitbereiche unterschiedlicher Spezies (Koelution) unweigerlich gegeben ist. Darüber hinaus ist ohne direkte Strukturaufklärung in vielen Fällen eine Identifikation gar nicht möglich, da beispielsweise für den Großteil der metall(oid)organischen Verbindungen weder Informationen über den Siedepunkt noch stabile Standards erhältlich sind.

Um auch für diese Substanzen, deren umweltchemische Relevanz im Folgenden Kapitel

erläutert wird, eine quantitativ und qualitativ validierbare Analytik zu ermöglichen war daher eine instrumentelle Erweiterung des vorhandenen Methodenspektrums mit vorrangig elementspezifischen Detektionstechniken durch die Integration eines molekülspezifische Detektors notwendig. Die konzeptionelle und konstruktive Umsetzung dieser methodischen Neuorientierung, sowie die Bestätigung der Anwendbarkeit durch die Bearbeitung realer Problemstellungen sind Gegenstand dieser Arbeit.

## 2 Theoretischer Teil

### **2.1 Umweltrelevanz und Toxizität metall(oid)organischer Verbindungen**

Während der Begriff Elementspezies allgemein zwischen den exakten chemischen Formen eines Elementes differenziert, bezeichnet man Metalle und Metalloide, die eine direkte kovalente Bindung zu einem organischen Rest aufweisen, konkreter als metall-(oid)organische Verbindungen.

Die besondere Relevanz dieser Verbindungen entsteht aus ihrer erhöhten Verfügbarkeit in biologischen und ökologischen Systemen aufgrund der gesteigerten Mobilität im Vergleich zum Element. Diese wiederum beruht auf dem amphiphilen Charakter von Metall(oid)en mit organischen Resten. Denn er ermöglicht sowohl den Transport in hydrophilen Kompartimenten, als auch die Akkumulation in lipophilem Gewebe. In Fällen akuter oder chronischer Kontamination besteht daher die Gefahr der Anreicherung in den höheren Trophieebenen der Nahrungskette.

Eine Auflistung der bisher in Umweltproben nachgewiesenen Organometall(oid)-verbindungen findet sich bei Dopp *et al.* [Dopp et al. 2004]. Neben wenigen Hydriden und Carbonylen stellen Alkylverbindungen den Hauptteil dieser Spezies. Die Übertragung einer Methylgruppe auf Metall(oid)e ist ein in der Umwelt häufig auftretender Prozess, der sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen stattfinden kann [Brinckman und Bellaman 1978]. Diese mikrobiell induzierte und vermutlich enzymatisch katalysierte Umwandlung wird als Biomethylierung bezeichnet und wurde in natürlichen Systemen bisher für Antimon, Arsen, Cadmium, Germanium, Quecksilber, Schwefel, Selen, Tellur und Zinn beschrieben [Craig und Glockling 1988] [Rapsomanikis und Weber 1986]. Als ein wichtiger und weit verbreiteter metabolischer Prozess kann dieser Transfer einer Methylgruppe sowohl in geogenen als auch in anthropogenen Systemen stattfinden [Bentley und Chasteen 2002]. Für mechanistische Betrachtungen des Biomethylierungsprozesses, sowie für ausführliche Angaben zur Entstehung, Verteilung und Toxizität metall(oid)organischer Verbindungen wird auf den bereits erwähnten Übersichtsartikel verwiesen [Dopp et al. 2004].

Für die Elemente, deren Spezies in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind im Folgenden einige diesbezügliche Daten aufgeführt.

### 2.1.1 Quecksilber

Dieses Metall ist unter Normalbedingungen flüssig und besitzt daher einen entsprechend hohen Dampfdruck. Es wird neben geringen Beiträgen aus natürlichen Quellen in der Hauptsache durch anthropogene Emissionen als Quecksilberdampf in die Umwelt eingebracht [Mason und Benoit 2003]. Da dieser eine lange Verweilzeit in der Atmosphäre besitzt [Boening 2000] und durch trockene und feuchte Niederschläge eine Deposition der wasserlöslichen Oxidationsprodukte und partikulär gebundener Spezies stattfindet, resultiert eine globale Verteilung dieses Elementes auch in der Hydro- und Geosphäre. Dadurch kommt es zur Kontaminierung entlegener Ökosysteme, auch wenn die häufig urbanen und punktuellen Emissionsquellen weit entfernt sind [Mason und Benoit 2003]. Ein Großteil dieser Emissionen entsteht durch das Schmelzen von Erzen in der Metallgewinnung. Aber auch durch die Verbrennung fossiler Energieträger gelangt Quecksilber in die Atmosphäre [Klaassen et al. 1986]. Ebenso ist durch die extensive Goldgewinnung, bei der Quecksilber zur Amalgamierung eingesetzt wird, ein signifikanter Eintrag in aquatische Systeme sowie die Atmosphäre zu verzeichnen. Die weitreichenden Folgen für die betroffenen Ökosysteme und Menschen wurden zum Beispiel für einen Teil des Amazonasgebietes in Brasilien dokumentiert [Akagi et al. 1995].

Quecksilber in elementarer Form oder als Organoquecksilberverbindung fand Verwendung in einer Vielzahl industrieller Anwendungen. Es wurde als Katalysator in der Chlor-Alkali-Synthese, in der Farbherstellung und der Holzverarbeitung sowie als Fungizid in der Agrarwirtschaft genutzt. Das Metall wurde bei der Herstellung von Batterien, aber auch in Pharmazeutika eingesetzt und wird heute noch in amalgamierter Form als Zahnfüllmaterial verwendet.

Auch wenn der industrielle Gebrauch von Quecksilber und dessen Verbindungen in den USA, in Europa und in den meisten anderen Ländern dank strikter Gesetzgebungen in den letzten Jahrzehnten stark reduziert wurde, stellen Altlasten in Sedimenten auch aktuell eine Gefährdung dar [Klaassen et al. 1986], [Mason und Benoit 2003]. Ein wichtiger Grund hierfür ist die Mobilisierung des anorganischen Quecksilbers durch Biomethylierung in Folge mikrobieller Aktivität in den aquatischen Systemen.

Seit einem tragischen Vergiftungsvorfall im Jahr 1956 an der Küste der japanischen



Minamata Bucht durch industrielle Einleitung von Quecksilber und anschließender Umwandlung zu Methylquecksilber (MMHg) durch Biomethylierung, ist diese Verbindung sowie deren Toxizität und Verteilung in der Umwelt Gegenstand zahlreicher Studien gewesen (z.B. [D'Itri 1991]). In diesem Zusammenhang wurde auch der mikrobielle Umwandlungsprozess durch Biomethylierung von Quecksilber ausführlich untersucht [Ford und Ryan 1995], [Weber 1999].

Die toxischen Effekte von Quecksilberdampf sind seit antiker Zeit bekannt. Schädigungen der Niere und der kognitiven Fähigkeiten als Folge massiver Quecksilbervergiftungen äußern sich in den als *Erethismus mercurialis* bezeichneten Symptomen wie Tremor (Zittern) und Sprachstörungen, bzw. einer allgemein erhöhten Empfindlichkeit gegenüber äußeren Reizen [Dopp et al. 2004].

Relevanten Expositionen von Quecksilberdampf sind heutzutage nur noch Arbeiter in der Quecksilber-Recyclingbetrieben oder in der Chlor-Alkali-Industrie ausgesetzt.

Insbesondere die Methyl-derivate des Quecksilbers sind hochgradig neuro- und embryotoxisch. Methylquecksilber ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und somit irreparable Schäden im visuellen Cortex und anderen Regionen des zentralen Nervensystems anzurichten.

Symptome einer Intoxikation sind daher unter anderem Wahrnehmungsstörungen und Einschränkungen des Sichtfeldes. Über die Plazenta kann Methylquecksilber auch das sich entwickelnde Gehirn ungeborener Kinder massiv schädigen und zu geistiger Retardierung und koordinativen Fehlfunktionen führen [Clarkson 2002].

Die mechanistische Erklärung für die neurotoxische Wirkung ist auf elektrophysiologischer Ebene zu suchen, da Methylquecksilber den Ausstoß von Neurotransmittern der praesynaptischen Nervenenden erheblich beeinflusst [Atchinson und Hare 1994].

Das Gefährdungspotential von Dimethylquecksilber übersteigt dabei das der Methyl-Verbindung um ein Vielfaches. Aufgrund seiner extrem lipophilen Eigenschaft kann eine äußerst effiziente dermale Resorption dieser Substanz stattfinden, vor der einfache Latexhandschuhe keinerlei Schutz bieten. Die Rekonstruktion der Todesursache der amerikanischen Chemikerin Karen Wetterhahn zeigte vor einigen Jahren, dass schon kleinste Mengen, die beim Abfüllen der Flüssigkeit auf den Handschuh gelangt waren, ausreichend sind, um innerhalb weniger Monate zum Tod zu führen.

Die erwähnte Biomethylierung von Quecksilber besonders in den aquatischen

Lebensräumen führt aufgrund der ebenfalls lipophilen Eigenschaften des Methylquecksilbers zu einer Bioakkumulation in marinen Organismen. So gelangt diese Verbindung in relevanten Konzentrationen in die Nahrungskette.

Neben der direkten Exposition durch die Kontamination bei Unfällen oder durch den erhöhten Fischkonsum in stärker belasteten Regionen stellt sich auch im Fall des Quecksilbers die Frage der mikrobiell induzierten Methylierung im menschlichen Organismus. Denn das inhalativ aufgenommene elementare Quecksilber wird im Blut oxidiert und in ionischer Form nicht nur über die Niere, sondern auch mit den Fäzes eliminiert. Somit stünde es zumindest teilweise als Substrat für die potenzielle intestinale Biomethylierung zur Verfügung

### **2.1.2 Zinn**

Sowohl anorganische als auch organische Zinnverbindungen besitzen eine Vielzahl industrieller Anwendungen. Aufgrund der verbreiteten Verwendung der Organozinnverbindungen und ihres ökotoxischen Gefahrenpotentials, das bereits in geringsten Konzentrationen besteht, gehören sie zu den am besten untersuchten Organometallspezies. Umweltrelevante Aspekte und die toxikologischen Eigenschaften sind dementsprechend ausführlich dokumentiert z.B. [Davies 1997].

Auch mengenmäßig haben vor allem butylierte und phenylierte Zinnverbindungen den größten Anteil an anthropogen in die Umwelt eingetragenen metall(oid) organischen Spezies [Bennet 1996].

Der Hauptanwendungsbereich von Mono- und Dibutylzinnverbindungen (MBSn und DBSn) ist die Verwendung als Thermo- und UV-Stabilisatoren bei der Herstellung von Produkten aus Polyvinylchlorid (PVC) und anderen Kunststoffen. Tributylzinnverbindungen (TBSn) werden wegen ihrer wachstumshemmenden Wirkung gegenüber Muscheln, Algen und anderen marinen Organismen als Anti-Fouling-Zusatz in Farben eingesetzt, die für den Anstrich von Schiffen genutzt werden. Obwohl diese Farbzusätze in der EU seit 1991 für Schiffe mit einer Länge unter 25 m verboten sind, wird allein der jährliche Eintrag von TBSn in die Nordsee auf 68 t geschätzt [Davies et al. 1998]. Weitere Verwendung finden dreifach butylierte Zinnverbindungen als Biozide zur Imprägnierung von Holz und Leder. Triphenylzinnverbindungen (TPhSn) werden in der Landwirtschaft als Fungizide eingesetzt [Lespes et al. 1997].

Als Folgen einer Intoxikation mit Trialkylzinnverbindungen werden neben

neurotoxikologischen Effekten die Unterbrechung mitochondrialer Funktionen und des Ionentransports, Zellmembranschädigung sowie die Inhibierung der ATP-Synthese beschrieben. Die Toxizität nimmt dabei von der Methyl- über die Ethyl- zur Butylverbindung ab [Craig 1986].

In in-vitro-Experimenten wurde die Schädigung der Erbsubstanz durch zinnorganische Verbindungen belegt [Jensen et al. 1991].

### **2.1.3 Arsen**

Das Metalloid Arsen ist als ubiquitär in der Erdkruste vorkommendes Element (durchschnittlich 2-5 mg/kg) in sämtlichen Umweltkompartimenten verteilt. Anorganische Arsenverbindungen wie Arsenit (As(III)) und Arsenat (As(V)) stammen sowohl aus geogenen Quellen als auch aus industriellen Emissionen. Vulkanismus und Verwitterung sind dabei für die natürliche Freisetzung von Arsen verantwortlich. Anthropogene Emissionen entstehen hauptsächlich durch den Einsatz von fossilen Brennstoffen, die einen natürlichen Arsengehalt aufweisen. Darüber hinaus gelangen Arsenverbindungen durch die Gewinnung arsenhaltiger Erze und deren Weiterverarbeitung in der Metallerzeugung in die Umwelt.

Anorganische Arsen(III)-verbindungen besitzen eine hohe akute Toxizität. Aufgrund der höheren Mobilität und Bioverfügbarkeit ist es 2-10 mal toxischer als Arsen(V). Die orale Aufnahme von 0,1 g des dreiwertigen Arsens kann bereits tödlich sein. Symptome einer Intoxikation sind schwere Durchfälle und Erbrechen, begleitet von knoblauchartigem Geruch und neurologischen Störungen.

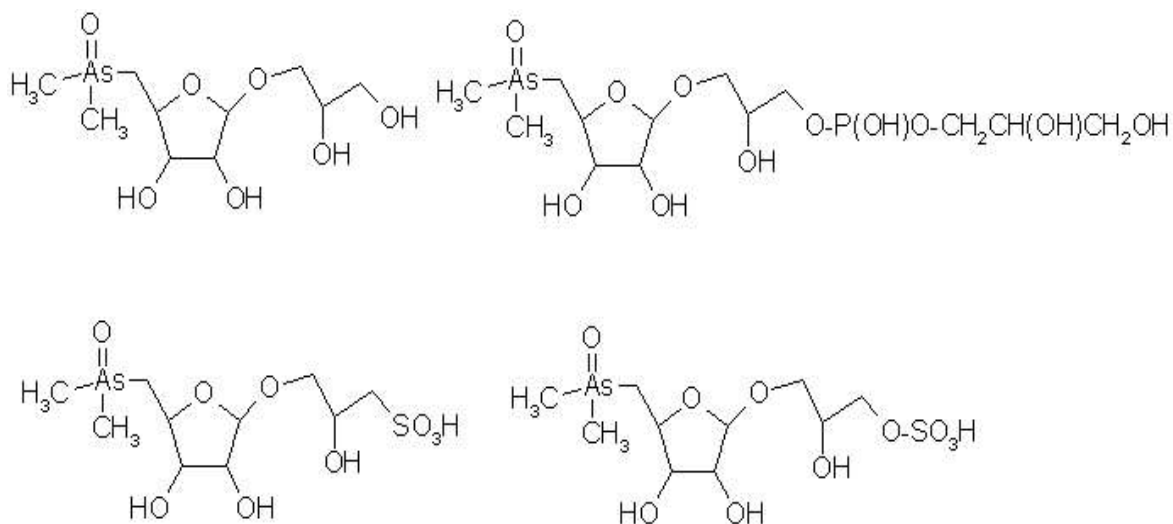
Dank wirksamer Emissionsschutzmaßnahmen und des weitgehenden Verbotes arsenhaltiger Herbizide und pharmazeutischer Präparate, die noch zu Anfang des Jahrhunderts gegen bakterielle Erkrankungen eingesetzt wurden, ist die Umweltbelastung in Mitteleuropa in den letzten Jahrzehnten stark reduziert worden. Daher sind akute Expositionen heutzutage eher von forensischer oder arbeitsmedizinischer Bedeutung als von umweltmedizinischer Relevanz [Bundesgesundheitsblatt 2003]. Problematischer sind diesbezüglich hingegen chronische Expositionen durch den Verzehr arsenhaltiger Nahrung oder durch belastetes Trinkwasser. Die überwiegend geogene Kontamination von Trinkwasserreservoirs durch anorganisches Arsen ist in Ländern wie Indien oder Bangladesch ein Gesundheitsproblem mit zum Teil katastrophalen Ausmaßen. [Aposhian et al. 2004]. Aufgrund dieser Gefährdung besteht weltweit für Millionen

von Menschen ein deutlich erhöhtes Risiko an Haut-, Lungen-, Blasen-, oder-Leberkrebs zu erkranken [NRC 1999].

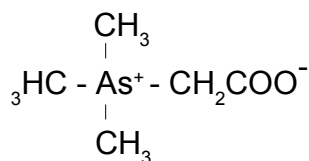
Meerwasser enthält Arsen in Konzentrationen von 1 bis 2 µg pro Liter, während marine Pflanzen und Tiere zwischen 1 und 100 mg pro kg Feuchtgewicht aufweisen können [Francesconi und Edmonds 1997].

Algen und andere niederen Pflanzenarten akkumulieren Arsenverbindungen, indem sie Arsenat zusammen mit dem Nährstoff Phosphat aufnehmen und unter Bildung von sogenannten Arsenozuckern (vgl. Abb. 2.1 A)) speichern. Diese unspezifische Metabolisierung liegt darin begründet, dass ihre Aufnahme- und Stoffwechselmechanismen nicht in der Lage sind effizient zwischen diesen homologen Elementen zu unterscheiden [Feldmann et al. 2004]. Ebenfalls durch direkte Absorption von Arsen aus dem Meerwasser sowie darüber hinaus durch den Verzehr arsenhaltiger Pflanzen gelangt das Element in Fische und Schalentiere, wo es als Arsenobetain ( $((\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{CO}_2$ , s. Abb. 2.1 B)) gespeichert wird.

A)



B)



**Abbildung 2.1: A) Beispiele für einige Arsenzucker mit unterschiedlichen Resten. B) Strukturformel für Arsenobetain**

Über die marine Nahrungskette findet eine Bioakkumulation des Elementes statt. So erklärt sich die enorme Anreicherung des Elements in marinen Organismen, deren Arsengehalte bis zu 100000 mal höher liegen können als die entsprechende Konzentration im Meerwasser [Edmonds und Francesconi 2003]. Während Arsenobetain schnell und unverändert vom menschlichen Körper ausgeschieden wird [Vather et al. 1994], und die Toxizität aufgrund eines hohen  $LD_{50}$  Wertes ( $> 10000$  mg/kg für Mäuse) als zu vernachlässigen gilt [Kaise und Fukius 1992], stehen besonders die dreiwertigen Arsenozucker aktuell in der Diskussion ein toxisches Potential zu besitzen [Francesconi et al. 2002], [Andrewes et al. 2004]. Ebenfalls für Diskussionen sorgte die Entdeckung von dreiwertigen methylierten Arsenverbindungen im Urin von Personen, die einer Exposition von anorganischem Arsen ausgesetzt waren [Aposhian et al. 2000b], [Valenzuela et al. 2005]. Aufgrund der höheren Toxizität der dreiwertigen methylierten Arsenverbindungen würde dieser Befund eine Steigerung der Toxizität durch körpereigene Methylierungsmechanismen bedeuten. Eine wichtige Aufgabe der Analytik ist es daher an dieser Stelle auch die qualitative Verifikation der gemessenen Spezies sicher zu stellen.

#### **2.1.4 Antimon**

Obwohl die Konzentration dieses Elements in der Erdkruste um eine Größenordnung geringer ist (0,2 mg/kg gegenüber 1,5 mg/kg im Falle des Arsens [Cox 1989]), ist Antimon ebenso wie Arsen ubiquitär in der Umwelt vorhanden und entstammt dabei sowohl natürlichen als auch anthropogenen Quellen. Das Metalloid wird in verschiedenen industriellen Produkten, wie Glaswaren, Keramiken, Farben und Pigmenten als Zusatzstoff verwendet und findet Einsatz als Komponente von Bleilegierungen. In Textilien, Kunst- und Klebstoffen wird Antimontrioxid ( $Sb_2O_3$ ) als Flammschutzmittel eingesetzt. Einige organische Antimonverbindungen von mengenmäßig zu vernachlässigender umweltchemischer Relevanz werden zu pharmazeutischen Zwecken unter anderem zur Bekämpfung von Parasiten benötigt [Andrewes und Cullen 2003]. Durch Verbrennung der erwähnten Gebrauchsgegenstände in der Abfallentsorgung sowie durch Erzabbau und -verarbeitung können lokal erhöhte Antimonkonzentrationen auftreten.

Der Nachweis organischer Antimonspezies ist bisher nur für die Methylderivate in einigen Umweltproben gelungen [Krupp et al. 1996], [Dodd et al. 1996]. Die Analytik anderer Antimonverbindungen scheiterte bisher im Wesentlichen an den geringen

Konzentrationen und der Abwesenheit stabiler Standards [Andrewes und Cullen 2003]. Auch über die Toxizität von Antimon ist aus diesem Grund bisher wenig bekannt. Eine Studie aus den 30er Jahren kommt zu dem Schluss, dass Trimethylantimon keine akute toxische Wirkung bezüglich der getesteten Tiere aufwies [Seifert 1939]. Eine mechanistische Betrachtung der Genotoxizität im Vergleich zu Arsen ergab, dass auch bei Antimon die Toxizität der dreiwertigen Verbindungen größer als die der fünfwertigen Spezies ist [Gebel et al. 1998].

### **2.1.5 Bismut**

Das Metalloid Bismut findet Verwendung in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten, aber auch in Katalysatoren, Pigmenten, Legierungen und keramischen Zusatzstoffen.

Besonders der Gebrauch in Konsumprodukten, wie zum Beispiel das als Pigment in Kosmetika verwendete Bismutoxichlorid ( $\text{BiOCl}$ ), und der Einsatz verschiedener Bismutverbindungen in Pharmazeutika hat zur Folge, dass über die Abwässer größere Mengen dieses Elements in den Klärschlämmen der Wasseraufbereitungsanlagen akkumulieren. Bismutkonzentrationen zwischen 1 und 5 mg/kg Trockengewicht wurden nachgewiesen [Michalke et al. 2000]. Als Folge dieses anthropogenen Eintrags konnte die Bildung von Trimethylbismut (TMBi) in Deponie- und Klärschlammgasen gezeigt werden [Feldmann et al. 1994]. Darüber hinaus wurde auch ein biogener Ursprung dieser Bismutspezies belegt [Michalke et al. 2000].

Obwohl es als ein Element mit vergleichsweise geringer Toxizität betrachtet wird [Palmieri 1993], sind in der Literatur einige Vergiftungsfälle, durch die Einnahme anorganischer Bismutpharmazeutika, belegt. Als Folge dieser Intoxikation wurden renale Fehlfunktionen, geistige Verwirrtheit und Enzephalopathie beobachtet [Slikkenveer und de Wolff 1989], [Buge et al. 1974]. Enzephalopathische Symptome wurden ebenfalls in Gasexpositionsversuchen mit TMBi bei Katzen und Hunden festgestellt. Es besteht daher die Hypothese, dass durch die Mikroflora des menschlichen Darmtrakts eine Umwandlung der anorganischen Bismutverbindungen zu TMBi stattfindet, welches dann für die beobachteten toxischen Symptome verantwortlich wäre [Michalke et al. 2002].

### 2.1.6 Selen

Selen besitzt überwiegend nichtmetallische Eigenschaften. Aufgrund einiger Parallelen zur Redoxchemie des Metalls Tellur und seines Status' als den Metalloiden verwandtes Element wird es jedoch häufig auch der letzteren Gruppe zugeordnet. Aus dieser Sonderstellung im Periodensystem resultieren einzigartige photochemische und elektronische Eigenschaften, die wiederum in der Verwendung in Solarzellen, elektronischen Bauteilen und bei der Herstellung von Fotokopiergeräten genutzt werden. Ein weiteres Hauptanwendungsgebiet ist der Einsatz in der Glasindustrie. Neben den Verlusten bei diesen industriellen Prozessen spielt die Verbrennung fossiler Brennstoffe eine Rolle bei der Emission von Selen in die Atmosphäre [Chau und Wong 1986].

Die Biomethylierung des natürlich als Spurenelement sowie durch anthropogene Einträge in der Umwelt vorkommenden Selens wurde sowohl für aerobe als auch für anaerobe Sedimente und Böden beobachtet. Methylierte Selenverbindungen sind daher in der Umwelt weit verbreitet [Craig und Maher 2003].

Neuere Studien belegen, dass auch der Mensch in der Lage ist, über die Nahrung aufgenommenes Selen zu methylieren und als Dimethylselen (DMSe) zu exhalieren [Kremer et al. 2005].

In Pflanzen, Nahrungsmitteln und anderen Organismen wie beispielsweise in Knoblauch oder auch Hefen sowie in Körperflüssigkeiten und Gewebeproben wurden eine Vielzahl von Selenocystein- und Selenomethioninverbindungen gefunden. Dort kommen sie vielfach als Bausteine von Proteinen wie zum Beispiel der Glutathion-Peroxidase vor [Craig und Maher 2003]. Dementsprechend wird Selen als essentielles Spurenelement klassifiziert, dem eine hilfreiche Wirkung bei der Prävention von Krebs und anderen Krankheiten zugeschrieben wird [Block 1996]. Die darin begründete Zunahme der Verwendung von Selenverbindungen als Zusatz in Nahrungsmitteln und Nahrungsergänzungspräparaten ist allerdings bedenklich, da bei Überdosierung auch toxische Effekte auftreten können. Ursache hierfür könnte die Inhibierung wichtiger Proteine sein [Gupta und Porter 2002]. Der Abstand zwischen den Effektniveaus ist dabei relativ gering und die Mechanismen, die für die gesundheitsfördernden oder gesundheitsschädigenden Auswirkungen verantwortlich sind, konnten bisher nur unzureichend aufgeklärt werden. Beispielsweise kann Selen Quecksilber von den Sulfhydrylgruppen der Proteine

verdrängen und so die Folgen einer Quecksilberintoxikation abmildern. Gleichzeitig kann aber in einigen Fällen die toxische Wirkung des Quecksilbers durch synergistische Effekte des Selen verstärkt werden [Craig und Maher 2003].

## **2.2 Instrumentelle Techniken zur Elementspeziation**

Grundvoraussetzung für die Analyse von Elementspezies ist eine reproduzierbare Trennung der verschiedenen Verbindungen. Hierzu werden vorrangig chromatographische Techniken eingesetzt.

Zur selektiven Trennung von gasförmigen und nach Derivatisierung flüchtigen Analyten wird in der Elementspeziesanalytik vorrangig die Gaschromatographie (GC) eingesetzt [Lobinski 1998], [Caruso und Montes-Bayon 2003]. Weitere Trennverfahren sind die Kapillarelektrophorese und Gaschromatographie mit superkritischen Flüssigkeiten. Die Trennung und Analyse in Lösung befindlicher Spezies wird in der Regel mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt.

Durch die Kopplung der chromatographischen Einheit an einen hochempfindlichen, elementspezifischen Detektor ist es möglich, Nachweisgrenzen im unteren Pikogramm-Bereich zu erreichen, die für die Untersuchung metall(oid)organischer Verbindungen in vielen Matrices erforderlich sind.

Die Aufnahme eines zeitaufgelösten Elementsignals ermöglicht dann die Zuordnung der chromatographisch getrennten Spezies dieses Elementes anhand der systemabhängigen Retentionszeit.

Verwendet werden zu diesem Zweck die Atomemissionsspektrometrie (AES) und die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) oder auch die Massenspektrometrie (MS). Während die Emissionstechniken jedoch häufig nicht sensitiv genug sind, ist die Detektion mittels Atomabsorption jeweils auf ein Element beschränkt. Demgegenüber stellt besonders die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaanregung (ICP-MS) eine hochempfindliche, multielementfähige und vielseitige Detektionsmethode dar [Feldmann 2005].

Aufgrund des elementspezifischen Charakters ist aber eine direkte Identifizierung zur qualitativen Validierung oder Aufklärung der Molekülstruktur im Falle unbekannter Spezies so nicht mehr möglich.

Diesbezüglich besitzen molekulare MS Techniken einen wesentlichen Vorteil. Durch



entsprechend sanftere Ionisierungstechniken werden die Moleküle nur fragmentiert und können anhand des charakteristischen und molekülspezifischen Fragmentmassenspektrums identifiziert werden. Zur Anregung und Fragmentierung kommen die folgenden Ionisierungstechniken zum Einsatz:

In Kombination mit der GC wird vor allem die Elektronenstoß Ionisierung (EI) eingesetzt. Für flüssige und feste Proben werden unter anderem die Elektrospray Ionisierung (ESI) und die Matrixunterstützte-Laser-Desorptions-Ionisierung (MALDI) verwendet.

Die grundlegenden Funktionsweisen von GC, ICP-MS und EI-MS werden im Folgenden näher erläutert, da diese Techniken als Bestandteile der vorgestellten Kopplungsmethode für die vorliegende Arbeit relevant sind.

### **2.2.1 Gaschromatographie (GC)**

Wie alle chromatographischen Trennverfahren beruht auch die GC auf multiplikativer, d. h. wiederholter Verteilung der zu trennenden Komponenten zwischen zwei Phasen in kontinuierlicher, also dynamischer Arbeitsweise.

Dabei ist eine stationär, während eine zweite, mobile Phase sich an dieser vorbei bewegt. Bei der Gaschromatographie ist die mobile Phase stets ein Gas (meist  $H_2$ ,  $N_2$ , He). Die stationäre Phase ist in der GSC (Gas Solid Chromatography bzw. Adsorptionschromatographie) ein poröser, polymerer Feststoff, während in der GLC (Gas Liquid Chromatography oder Verteilungschromatographie) eine meist viskose Flüssigkeit als stationäre Phase dient [Schomburg 1977].

#### **♦ Physikalische Grundlagen**

Bei einem Gemisch einer Flüssigkeit und eines Gases, wie es in der Gaschromatographie vorliegt, entscheidet unter isothermen Bedingungen der Dampfdruck der Komponenten über deren Gleichgewichtsverteilung zwischen den beiden Phasen.

Der partielle Dampfdruck eines gelösten Stoffes ist von dessen Konzentration in der jeweiligen Lösung bzw. Mischung abhängig. Trägt man den bei konstanter Temperatur gemessenen Partialdruck einer Komponente für verschiedene Konzentrationen dieser Komponente in der flüssigen Phase auf, erhält man ein Dampfdruckdiagramm, das diese Abhängigkeit veranschaulicht (s. Abb. 2.2).

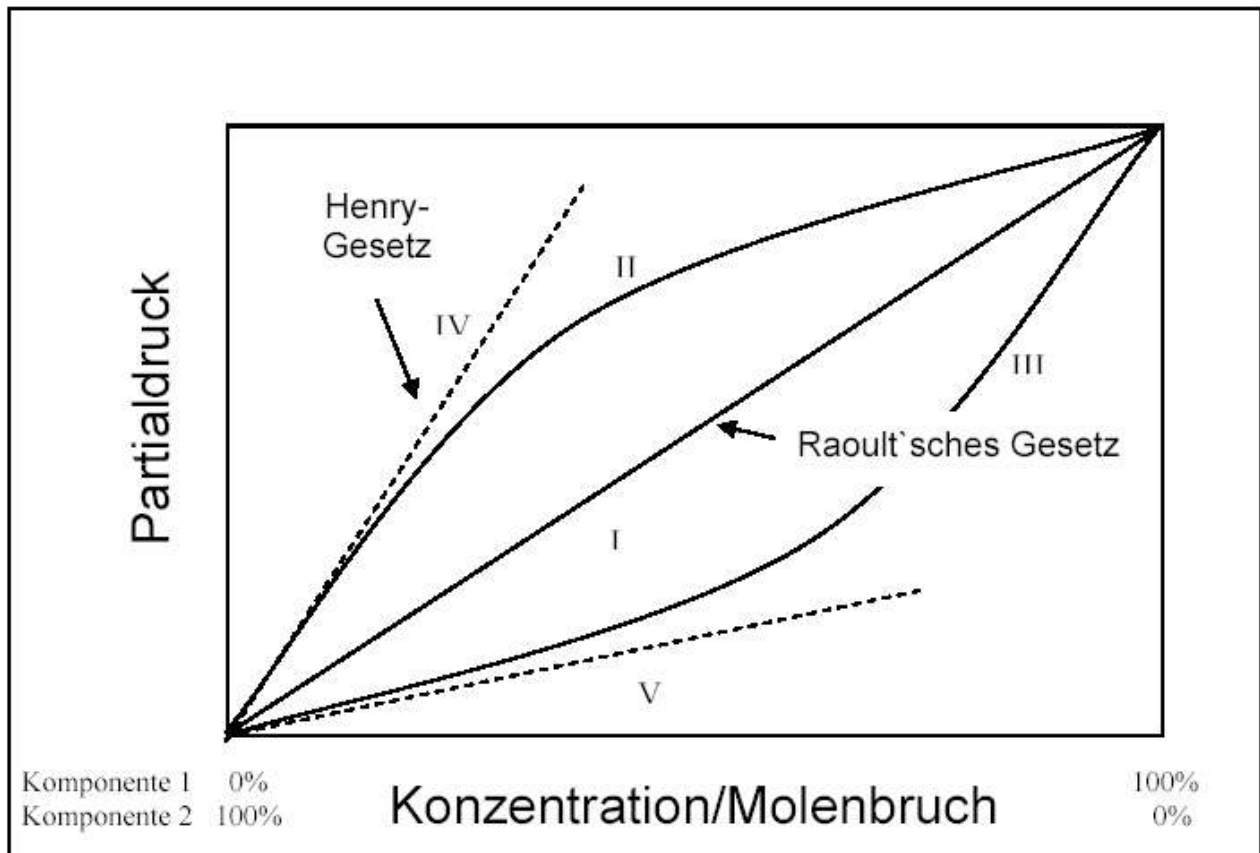


Abbildung: 2.2: Abhängigkeit des Partialdrucks einer gelösten Komponente von deren Konzentration in der Lösung.

Im Falle idealer Mischbarkeit, d.h. wenn gelöste Komponente und stationäre Flüssigkeit von gleicher Substanzklasse sind, gilt das Raoult'sche Gesetz :

$$p_i = x_i \cdot p_i^0 \quad \text{Gl. 2.1}$$

Es wird in Abbildung 2.2 (Kurve I) veranschaulicht und besagt, dass der Dampfdruck ( $p_i$ ) der Mischungskomponente  $i$  über der flüssigen Mischung linear vom Dampfdruck ( $p_i^0$ ) der reinen Komponente  $i$  und von der Konzentration (Molenbruch  $x_i$ ) in der Mischung abhängt.

Dieses „ideale Verhalten“ ist nur dann zu erwarten, wenn die den Dampfdruck bestimmenden Wechselwirkungen zwischen den Molekülen der Sorte  $i$  und denen der stationären Flüssigkeit von der gleichen Art sind, wie die zwischen den Molekülen gleicher Sorte.

Bei nicht idealen Mischungen erhält man Isothermen, die vom Raoult'schen Gesetz

abweichen. (Abb. 2.2 S. 14 Kurve III + II). Für diese beiden Kurven gilt die Beziehung,

$$p_i = \gamma_i \cdot x_i \cdot p_i^0 \quad \text{Gl. 2.2}$$

Worin  $\gamma_i$  der Aktivitätskoeffizient der Komponente ist. Er ist, wie aus der Krümmung der Kurven ersichtlich, konzentrationsabhängig. In verdünnten Lösungen, wie sie in der Gaschromatographie vorkommen, kann der Aktivitätskoeffizient über einen begrenzten Bereich als konstant angesehen werden. Der Dampfdruck der gelösten Komponente lässt sich in diesem Konzentrationsbereich durch das Henrysche Gesetz beschreiben. Den Term  $\gamma_i \cdot x_i$  fasst man zur Henry-Konstante zusammen. Der Verlauf dieser Isothermen ist ebenfalls in Abb. 2.2 (S. 14) (dargestellt (Kurven IV+V).

Erfolgt die Einstellung des Phasengleichgewichts zwischen mobiler und stationärer Phase im linearen Bereich der Verteilungskurven, spricht man von linearer Gaschromatographie [Leibnitz und Struppe 1970].

#### ♦ *Chromatographische Parameter*

Ein Chromatogramm besteht aus einer Basislinie und einer Anzahl von Peaks, die der Zahl der Komponenten des zu trennenden Gemisches entspricht, da für jede Komponente ihrem Dampfdruck entsprechend eine unterschiedliche Verweilzeit innerhalb des chromatographischen Systems resultiert, die als Retentionszeit bezeichnet wird. Ein Peak wird durch die kontinuierliche Registrierung eines Signals erhalten, welches der Konzentration der Komponente im Trägergas proportional ist. Dadurch ist für jede getrennte Komponente ein zeitabhängiges Konzentrationsprofil gegeben, das von der Basislinie ansteigt, ein Maximum durchläuft und wieder auf die Basislinie abfällt, wenn keine „Überlappung“ durch die Komponente stattfindet, die als nächste eluiert wird. Gelten bei isothermer Arbeitsweise das Raoult'sche bzw. das Henrysche Gesetz, besteht also ein linearer Zusammenhang zwischen Partialdruck in der Gasphase und Konzentration einer Komponente in der stationären Phase, besitzt dieses Profil in erster Näherung die symmetrische Form einer Gaußschen Glockenkurve. Jedem Peak wird eine systemspezifische Retentionszeit (RT) zugeordnet. Diese Bruttoretentionszeit  $t_{sm}$  ist definiert als zeitlicher Abstand des

Peakmaximums vom Zeitpunkt der Injektion mit dem das Chromatogramm beginnt. Sie setzt sich zusammen aus der Aufenthaltszeit in der mobilen Phase  $t_m$  und der Verweilzeit in der stationären Phase  $t_s$ ,

$$t_{ms} = t_m + t_s \quad \text{Gl. 2.3}$$

$t_m$  wird auch Totzeit genannt und ist die Zeit, die eine Komponente benötigt, um das chromatographische System zu durchlaufen, ohne mit der stationären Phase in Wechselwirkung zu treten. Die Nettoretentionszeit  $t_s$  ist die Differenz zwischen Bruttoretentionszeit und der Totzeit  $t_m$ .

Das stoffspezifische Kapazitätsverhältnis  $k'$  gibt die Lage des Peaks einer Substanz im Chromatogramm an.

$$k' = \frac{t_{ms} - t_m}{t_m} \quad \text{Gl. 2.4}$$

Bei konstanter Strömung und Temperatur ist  $t_s$  der Menge an flüssiger Phase und  $t_m$  dem Gasvolumen der Säule proportional. Das Kapazitätsverhältnis ist also auch ein Maß dafür, wie viel stationäre Flüssigkeit insgesamt in der Säule enthalten ist. Die relative Retention  $\alpha$ , auch Trennfaktor oder Selektivitätskoeffizient genannt, ist definiert als

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \text{Gl. 2.5}$$

also als Quotient zweier Kapazitätsverhältnisse, wobei im Nenner das Kapazitätsverhältnis einer Bezugssubstanz steht.

Die relative Retention gibt keine Information über die Güte einer Trennung, da trotz gleichem  $\alpha$ -Wert zwei Peaks überlappen können, wenn sie sehr breit sind, oder als isolierte Peaks erscheinen wenn sie entsprechend schmal sind. Deshalb wird bei der Definition der Auflösung  $R$  zwischen zwei benachbarten Peaks die Halbwertsbreite

$b_{0,5}$  mit einbezogen:

$$R = \frac{t_{ms_1} - t_{ms_2}}{(b_{0,5})_2 + (b_{0,5})_1} \quad \text{Gl. 2.6}$$

Bis zu einem Wert von  $R = 0,5$  können zwei Maxima noch getrennt erkannt werden und damit als aufgelöst bezeichnet werden.. Bei einem Zahlenwert von 1,5 ist 100% Auflösung erreicht. Je größer also der Zahlenwert, desto höher ist die Trennkraft der Säule in Bezug auf die betrachteten Komponenten. Geht der Wert für  $R$  gegen 0 ist eine Trennung unter den gewählten chromatographischen Bedingungen nicht möglich. Man spricht dann von Koelution.

♦ *Theoretische Böden und van Deemter-Theorie*

Zur Beurteilung der Effizienz einer Trennsäule überträgt man das Konzept des theoretischen Bodens aus der destillativen Trennung auf die Chromatographie. Ein solcher Boden ist eine theoretische Annahme und repräsentiert den Teil der Säule, in dem sich das Verteilungsgleichgewicht einmal einstellt.

Das Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens  $H$  (*Height equivalent to a theoretical plate HEPT*) errechnet sich aus der Länge der Säule  $L$  dividiert durch die Anzahl der theoretischen Böden  $N$ .

$$H = \frac{L}{N} = \text{HEPT} \quad \text{Gl. 2.7}$$

Bei gegebener Länge verhalten sich Bodenzahl und Bodenhöhe also umgekehrt proportional. Wie bei der Destillation nimmt die Effizienz der Trennung mit steigender Bodenzahl zu. Eine Minimierung der Bodenhöhe liefert also eine Steigerung der Trenneffizienz der Säule.

Die Breite eines Peaks hängt bei idealer Propf Aufgabe ( $\Delta t \ll t_{ms}$ ) nur von der Trennkraft der Säule und der Retentionszeit ab. Die Trennstufenzahl  $N$  kann daher nach der folgenden Näherungsformel aus der Peakbreite unter Annahme einer Gaußfunktion errechnet werden.

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_{ms}}{b_{0,5}} \right)^2 \quad \text{Gl. 2.8}$$

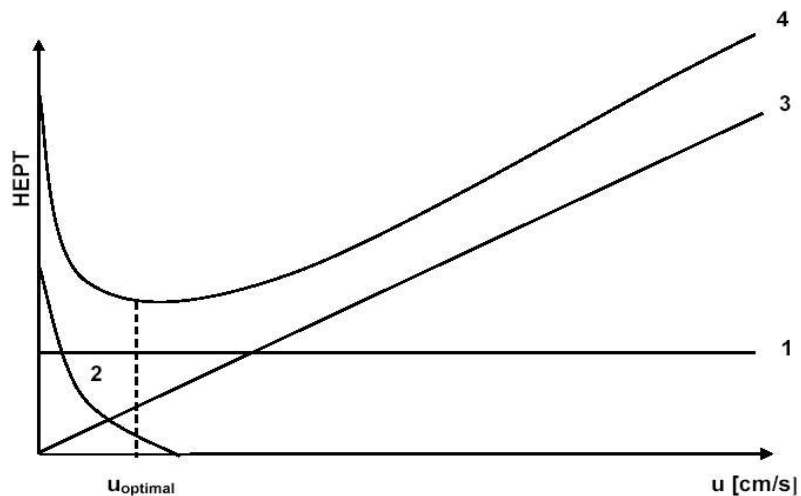
$H$  gilt daher auch als Maß für die relative Peakverbreiterung und wurde durch van-Deemter [Van Deemter 1956] in der folgenden allgemeinen Form mit der Strömungsgeschwindigkeit  $u$  in Beziehung gesetzt.:

$$H = A + B \cdot u + C \cdot \frac{1}{u} \quad \text{Gl. 2.9}$$

Der Term  $A$  beschreibt die Auswirkung der Eddy-Diffusion und der Strömungsverteilung auf die Peakverbreiterung. Er ist unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit, aber nur bei gepackten Säulen, bei denen Mehrweg-Effekte sowie Wirbeldiffusion eine Rolle spielen zu berücksichtigen.

$B$  ist proportional zu  $u$  und charakterisiert das Abweichen von der Gleichgewichtskonzentration durch Stoffaustausch-Effekte und Querdiffusion. Hier liegt häufig der dominierende Einfluss auf die Gesamtpeakverbreiterung.

Die Longitudinaldiffusion der Probenmoleküle in der mobilen Phase verhält sich antiproportional zu  $u$  und verursacht ebenfalls eine Verbreiterung des Peaks. Sie wird durch den Term  $C$  beschrieben. Abbildung 2.3 veranschaulicht die einzelnen Anteile sowie die resultierende allgemeine Van Deemter – Kurve.



**Abbildung 2.3:** Die allg. Van Deemter-Kurve (1 Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung, 2 Längsdiffusion, 3 Stoffaustausch, 4 resultierende van Deemter-Kurve  $H(u)$ )

In der Praxis werden häufig höhere Gasgeschwindigkeiten als  $u_{opt}$  gewählt, da meist genügend Trennleistung zur Verfügung steht, und höher Strömungsgeschwindigkeiten kürzere Analysezeiten ermöglichen [Schomburg 1977].

### 2.2.2 Induktiv gekoppeltes Plasma mit massenspektrometrischer Detektion (ICP-MS)

In einem hochenergetischen, elektromagnetischen Wechselfeld werden die Atome des sogenannten Plasmagases (Argon, Stickstoff oder Helium) ionisiert und ungerichtet beschleunigt. In einem solchen Plasma, welches zur Zerlegung von Molekülen in seine Atome dient, entsteht bei diesem Prozess eine hohe thermische Energie mit Temperaturen bis zu 8000 K.

Flüssige Proben werden zunächst mit Hilfe eines Zerstäubers in ein Aerosol überführt. Da größere Tröpfchen das Plasma zu stark abkühlen würden, werden in der Sprühkammer ca. 95% der zugeführten Flüssigkeit abgetrennt und nur die allerfeinsten Tröpfchen vom Make-up Gasstrom in Richtung Plasma mitgeführt.

Dort werden die Analytmoleküle nach Verdampfung des Wassers durch die Kollision mit den Atomen des Plasmagases nahezu vollständig atomisiert und ionisiert.

Der Ionenstrom passiert dann ein spezielles Interface, das für den Druckausgleich zwischen dem Plasma und dem Vakuum des Analysators sorgt. Bevor die Ionen aber den Analysator erreichen, werden sie durch ein System elektronischer Linsen

beschleunigt und fokussiert.

Zur Unterscheidung verschiedener Elementmassen dient bei einem Quadrupol-Massenspektrometer das Verhältnis von Masse und Ladung eines Ions. Vier Metallstäbe sind hier kreuzweise angeordnet und so verschaltet, dass sie bei Anlegen einer Wechselspannung ein elektrisches Feld ausbilden. Dieses ist so einstellbar, dass nur eine Ionensorte mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) die Schwingungen des Feldes nachvollziehen kann ohne mit den Metallstäben zu kollidieren. Da eine solche Kollision eine Entladung des Ions bedeutet und dieses dann nicht mehr beschleunigt wird, können nur Ionen eines Elementes (Isotops) bei der jeweiligen Spannungsmodulation die Metallstäbe passieren und den Detektor erreichen. Um Störungen durch unkontrollierte Kollisionen mit Molekülen der Umgebungsluft zu minimieren, wird der Quadrupolanalysator evakuiert.

Die eigentliche Detektionseinheit ist bei dieser Technik ein Elektronenvervielfacher (EV) der auf elektronischem Weg die eintreffenden Ionen registriert und als Zählrate (counts) ausgibt.

In der Routineanalytik wird die ICP-MS überwiegend zur Quantifizierung von Spurenelementen in verdünnten Aufschlusslösungen oder im Trinkwasser eingesetzt. Es wurde daher zunächst nur auf die Untersuchung flüssiger Proben eingegangen. Die Kopplung mit einem GC zur Untersuchung gasförmiger Proben stellt eine Spezialanwendung dar, für die geringfügige apparative Veränderungen im Bereich des Probenzuführung vorzunehmen sind. Da die Entwicklung einer solchen Kopplung Bestandteil der vorliegenden Arbeit war, werden diese technischen Details zu einem späteren Zeitpunkt thematisiert (s. Kap. 3.2.2 S.50).

Das analysierbare Elementspektrum umfasst dabei theoretisch beinahe die gesamten Nebengruppenmetalle sowie die Metalle und Metalloide der I. bis VI. Hauptgruppe. In Einzelfällen bestehen Einschränkungen durch isobare Interferenzen, die beispielsweise die Nachweisgrenzen von Selen und Arsen beeinträchtigen, da im Plasma gebildete Molekülionen (z.B.  $\text{Ar}_2$  u.  $\text{ArCl}^+$ ) die Massen des Analyten überlagern. Die Analyse der analytisch relevanten Nichtmetalle Chlor, Schwefel und Phosphor sowie Silizium ist mit einem einfachen Quadrupol Gerät, wie es in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand, aufgrund ähnlicher Störungen durch isobare Moleküle nicht möglich.

Genauer zu den Ionisierungsvorgängen im Plasma und zur Funktionsweise des



Interface zwischen ICP und MS sowie des Quadrupol-MS selbst, ist vorangegangenen Dissertationsarbeiten [Feldmann 1995], [Krupp 1999] zu entnehmen. Die Spezifikation der verwendeten ICP-MS Apparatur und die entsprechenden Betriebsparameter werden im analytischen Teil dieser Arbeit beschrieben.

### **2.2.3 Elektronenstossionisierung mit massenspektrometrischer Detektion (EI-MS)**

Die Massenspektrometrie ist ein Strukturaufklärungsverfahren, das hauptsächlich in der organischen Chemie eingesetzt wird. In einem Massenspektrometer werden die Moleküle durch Elektronenstoß (EI) destabilisiert. Dadurch entstehen positiv und negativ geladene Ionen. Negative Ionen haben bei Elektronenstoß Ionisierung praktisch keine Bedeutung, bei der Chemischen Ionisierung (CI) werden sie zum Beispiel zum Nachweis halogener Verbindungen herangezogen (NCI).

Die gebildeten Ionen zerfallen in Bruchstücke (Fragmente), die dann nach ihrem Verhältnis von Masse und Ladung ( $m/z$ ) getrennt werden. Im Massenspektrum werden Massenzahl gegen Intensität aufgetragen. Die Fragmentbildung ist unter normierten Bedingungen charakteristisch für das jeweilige Molekül.

Zur Identifikation der Verbindungen kommen in der Regel Datenbankprogramme zum Einsatz, die durch den Vergleich mit Bibliotheksspektren hinsichtlich der vorhandenen Massen und deren Häufigkeit (abundance) Wahrscheinlichkeiten für eine positive Übereinstimmung ermitteln. Während für unbekannte Verbindungen, deren Spektren noch nicht registriert wurden, die Interpretation der Fragmentmuster erforderlich bleibt, wird die Zuordnung bekannter Verbindungen hierdurch erheblich vereinfacht.

Normalerweise handelt es sich bei dem Ion höchster Masse im Massenspektrum um das Molekülion, das zugehörige Signal wird als Molekülpeak bezeichnet. Die übrigen Ionen sind daraus direkt oder mehrstufig gebildete Fragmentionen, sogenannte Primär- und Sekundärfragmentationen.

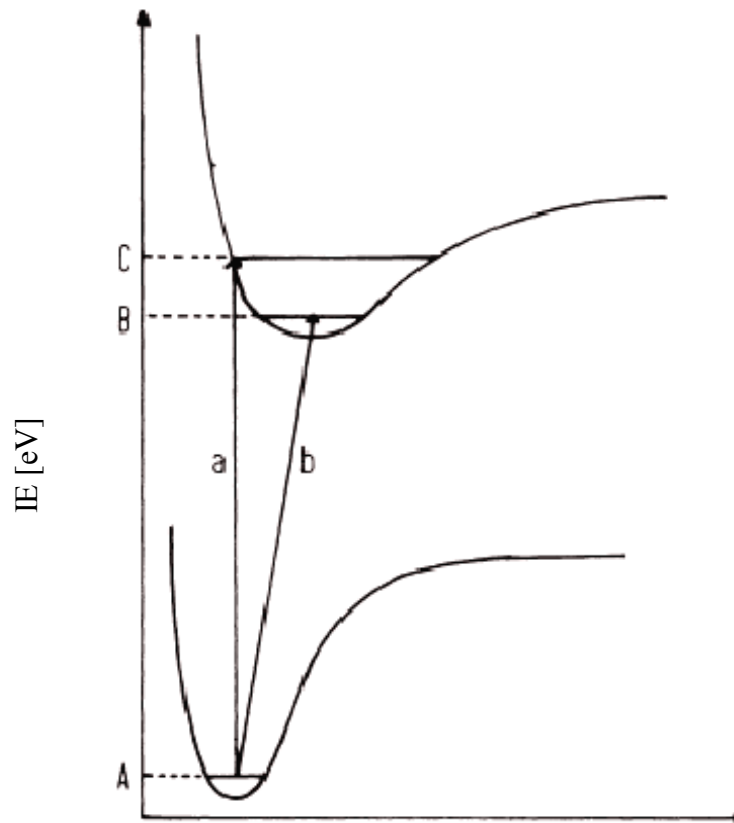
Alternativ zur Aufnahme des vollständigen Massenspektrums im sogenannten scan Modus können im SIM Modus (single ion monitoring) einzelne Ionen (häufig das Molekülion) bekannter Analyten selektiert werden und quantitative Analysen mit hoher Empfindlichkeit durchgeführt werden.

♦ *Physikalisch-chemische Grundlagen*

Um positive Ionen durch Abspaltung eines Elektrons zu bilden, ist Energie notwendig. Als Ionisierungspotenzial (IP) oder als Ionisierungsenergie (IE) bezeichnet man entsprechend die Differenz der Bildungsenthalpien von Molekül und Molekülion in ihren Grundzuständen. Die für die Entfernung eines Elektrons aus dem höchsten besetzten Orbital im elektronischen Grundzustand eines neutralen Teilchens (Atom, Radikal, Molekül) notwendige Mindestenergie ist die erste IE. Für die Entfernung von weiteren Elektronen gibt es eine Reihe höherer Ionisierungsenergien. Befinden sich das Neutralteilchen und das Ion im Schwingungsgrundzustand (0,0-Übergang, vgl. Abb. 2.4 S. 23: A→B) spricht man von einem adiabatischen IP.

Im Normalfall ist bei einer Ionisierung die Born-Oppenheimer-Näherung erfüllt. Da dieser Vorgang sehr schnell ist (ca.  $10^{-16}$  s) verglichen mit den Molekülschwingungen ( $10^{-12}$ – $10^{-13}$  s), folgt die Besetzung der Zustände im vibronisch hoch angeregten Molekülion dem Franck-Condon-Prinzip, demzufolge sich die Kernpositionen während der Ionisierung nicht ändern. Man darf daher davon ausgehen, dass das Molekülion zumindest anfänglich noch die Struktur des neutralen Moleküls besitzt und spricht dementsprechend von einem vertikalen IP (vgl. Abb. 2.4 S. 23: A→C).

Bei organischen Verbindungen entstehen meist Ionen in angeregten Schwingungszuständen. Die für die Ionisierung notwendige Energie (IE) wird meist in Elektronenvolt (eV) angegeben. Die IE der meisten Elemente liegt zwischen 5 und 20 eV, die der meisten organischen Verbindungen zwischen 8 und 13 eV.



**Abbildung 2.4:** Elektronenübergänge bei der Ionisierung a) vertikal (Frank-Condon-Übergang) b) adiabatisch (0,0-Übergang) (modifiziert aus [Budzikiewicz und Schäfer 2005])

Unter EI-Bedingungen werden die zu untersuchenden Moleküle isoliert in der Gasphase bei  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  mbar mit Elektronen hoher kinetischer Energie (meist 70 eV) beschossen. Dabei werden aus dem Molekül ein oder seltener zwei Elektronen herausgeschlagen. Aus dem Molekül M wird so das Molekülion  $M^{+\bullet}$ , ein positives Radikalkation mit ungerader Elektronenzahl und offener Schale oder gegebenenfalls ein doppelt geladenes Ion  $M^{2+}$  mit gerader Elektronenzahl und geschlossener Schale.

Bei der Wechselwirkung von Elektron und Molekül mit 70 eV wird meist wesentlich mehr Energie als die Ionisierungsenergie auf das Molekül übertragen. Der Überschuss ist die innere Energie des Molekülions, die als Schwingungs- und Rotationsanregung vorliegt.

Unter diesen Bedingungen, mit denen die Ionen in den meisten EI-

Massenspektrometer standardmäßig erzeugt werden, ist der Überschuss an innerer Energie groß genug, um bereits in der Ionenquelle eine Fragmentierung - entweder zu einem Ion mit geschlossener Schale und einem Radikal (radikalische Spaltung) oder zu einem neuen Radikalion und einem neutralen Molekül (Umlagerungsfragmentierung) - zu erreichen.

Die Primärfragmente haben zum Teil noch genügend innere Energie, um weiter zu zerfallen. Es finden daher gleichzeitig Konkurrenz- und Folgereaktionen in der Ionenquelle statt. Je höher die innere Energie eines Ions ist, umso schneller fragmentiert es. Zunehmende Stabilität des Ions führt zu einem intensiveren Peak im Spektrum, da es langsamer weiter zerfällt und die Häufigkeit, mit der es detektiert wird, zunimmt. Ionen mit geschlossener Schale fragmentieren fast ausnahmslos unter Neutralabspaltung, radikalische Spaltungen treten quasi nur aus offenschaligen Ionen auf („even-electron-rule“).

Für elektronenstoßinduzierte Zerfallsreaktionen organischer Verbindungen lassen sich die folgenden allgemein gültigen Regeln formulieren.

- |         |  |
|---------|--|
| Regel 1 | C-C-Bindungen an Verzweigungsstellen werden bevorzugt gespalten.   |
| Regel 2 | Doppelbindungen oder Doppelbindungssysteme fördern die Spaltung der allylischen oder benzyllischen Bindung.<br>Sonderfall: Retro-Diels-Alder-Reaktion.   |
| Regel 3 | Heteroatome fördern als Elektronendonatoren die Fragmentierung der Bindung zum heteroatomtragenden C-Atom; die Ladung verbleibt bevorzugt auf der Seite des C-Atoms.   |
| Regel 4 | Doppelbindungen und Heteroatome fördern als Wasserstoffakzeptoren die Umlagerung eines Wasserstoffs in einem sechsgliedrigen (weniger oft vier- oder x-gliedrig), cyclischen Übergangszustand (McLafferty-Umlagerung). |

Da Metalle und Metalloide ebenfalls für eine Polarisierung der Bindung zum Kohlenstoff sorgen und diese damit schwächen, kann Regel 3 auch für die zu

erwartende Fragmentierung von Organometall(oid)verbindungen als gültig erachtet werden.

Allerdings ist die Spaltung dann nicht auf die Elektronendonorfunktion zurückzuführen, wie es etwa bei einem N- oder O-Atom der Fall ist. Aufgrund der normalerweise geringeren Elektronegativität ist außerdem der Verbleib der Ladung am Metall oder Metalloid unter Bildung eines radikalischen C-Atoms wahrscheinlicher, als die im zweiten Teil der Regel vorausgesagte Situation.

Darüber hinaus lassen sich diesbezüglich nur ganz allgemein die Stevenson [Stevenson 1951] und Steveson-Audier [Audier 1969] Regeln zitieren, nach denen bei simplen Bindungsspaltungen die Ladung bei dem freien Radikal oder Molekül verbleibt, welches die geringere Ionisierungsenergie aufweist.

Der angesprochene elektropositive Charakter von Metallen und Metalloiden begünstigt dabei die Bildung distonischer (distonic) Radikalkationen, in denen Ladung und radikalisches Zentrum getrennt lokalisiert sind, gegenüber dem isomerisierten, delokalisierten Radikalion. Dadurch erhöht sich wiederum die Wahrscheinlichkeit von Umlagerungsreaktionen, die neben verschiedenen weiteren Fragmentierungs- und Umlagerungstypen von Ponomarev und Koautoren unter Einbeziehung organometall(oid)haltiger Verbindungen in einem mehrteiligen Aufsatz [Ponomarev et al. 2002] systematisiert worden sind.

Über das bereits Erwähnte hinaus ließen sich aus dieser zuletzt zitierten Arbeit aber keine verallgemeinernden Aussagen ableiten, die analog der vierten Regel auf die Fragmentierungsprozesse metall(oid)organischer Verbindungen übertragen werden könnten.

♦ *Isotopie in der Massenspektrometrie*

Die natürlich vorkommenden Elemente sind in der Mehrzahl keine Reinelemente sondern Gemische von Isotopen die, da sie unterschiedliche Massen aufweisen, bei der massenspektrometrischen Analyse getrennt werden. Man kann grob folgende massenspektrometrisch relevante Gruppen einteilen:

1. Reinelemente wie  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{127}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Cs}$  oder  $^{209}\text{Bi}$  (insgesamt 17).
2. Elemente mit einem Hauptisotop und ein oder zwei Begleitisotopen von sehr geringer Häufigkeit ( $< 0,5\%$ ). Dazu gehören  $^1\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ . Für die meisten Zwecke lassen sie sich wie die Reinelemente berücksichtigen (insgesamt 5).
3. Elemente mit einem Hauptisotop und ein bis 3 Begleitisotopen von geringer Häufigkeit ( $< 10\%$ ). Dazu gehören  $^{12}\text{C}$ ,  $^{28}\text{Si}$  und  $^{32}\text{S}$ . (insgesamt 9, eine Ausnahme bildet Ca, das 4 Begleitisotope besitzt, die jedoch zusammen weniger als 5 % ausmachen).
4. Elemente, die mit zwei Isotopen vergleichbarer Häufigkeit auftreten, wie  $^{10}\text{B}$ ,  $^{11}\text{B}$  oder die Halogene  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ,  $^{79}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Br}$  sowie  $^{121}\text{Sb}$ ,  $^{123}\text{Sb}$  (insgesamt 11).
5. Elemente mit mehreren Isotopen und relativ gleichmäßiger Verteilung, wie Hg, Sn, Ru, Se, Te, Pb etc.

Die Häufigkeit der Moleküle, die ein Molgewicht haben, das eins, zwei, drei oder mehr Masseneinheiten über dem Molgewicht des monoisotopischen Moleküls liegt, hängt von der Anzahl der vorhandenen Atome ab und von der relativen Häufigkeit der Isotope in den beteiligten Elementen. Im Massenspektrum werden die Ionen verschiedener Isotopenmassen nebeneinander abgebildet und es entsteht ein charakteristisches Isotopenmuster.

Im praktischen Sprachgebrauch bezeichnet man bei Verbindungen, die neben den monoisotopischen Elementen wie F, I oder P nur C, H, O, N, oder S enthalten, die Kombination der häufigsten Isotope ( $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ ) als Molekülion. Dementsprechend ergibt sich das Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  46 für ein Molekül

mit der Summenformel  $C_2H_5OH$ . Die sich aus Kombinationen von  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ,  $^{18}O$  usw. ergebenden Molekülionen werden als Satelliten- oder Isotopensignale oder -peaks bezeichnet; Analoges gilt auch für Fragmentionen. Sind andere Elemente zusätzlich vorhanden, so kann man sich bei diesen entweder auf das leichteste oder auf das häufigste Isotop beziehen. Man sollte jedoch in solchen Fällen angeben, welches Isotop man der Berechnung zugrunde gelegt hat (z. B.  $(C_2H_5)_4Pb$ :  $M+ 322$  für  $^{206}Pb$ ). Als isobar bezeichnet man Teilchen mit gleicher nomineller Masse (im Rahmen der gegebenen Auflösung gleicher Summe von Massenzahlen, z.B.  $^{40}Ar$  : 39,9624,  $^{40}Ca$  : 39,9626;  $C_2H_4$  : 28,0313,  $CO$  : 27,9949).

#### ♦ Funktionsweise eines Massenspektrometers

Um eine Probe im Bereich von  $\mu\text{mol}$ -Mengen in das Massenspektrometer einzuführen, gibt es indirekte und direkte Einlass-Systeme. Bei einem indirekten Einlass wird die Probe gasförmig in das Spektrometer eingebracht. Hierzu wird in der Regel die Probe über die Kopplung des Massenspektrometers mit einem Chromatographen eingeführt. Dazu wird seit langem die Gaschromatographie (GC/MS) genutzt.

Vor allem in der Biochemie und der Medizin gewinnt aber die Kopplung mit der Flüssigkeitschromatographie (LC/MS) zunehmend an Bedeutung, da durch spezielle Aufgabe- und Ionisierungstechniken (vgl. Kap. 2.3.1 S. 32) Strukturuntersuchungen an Proteinen und anderen Makromolekülen möglich geworden sind.

Der direkte Einlass ist für die Analyse von Verbindungen notwendig, die sich schlecht im Injektor eines GC verdampfen lassen. Solange die Analyten unzersetzt verflüchtigt werden können, lassen sich beispielsweise Feststoffe von der Spitze einer Schubstange aus einem beheizbaren Tiegel in die Ionenquelle einschleusen. Da bei dieser Technik weniger Substanzverlust als bei indirektem Einlass auftritt, reichen oft Mengen im Nanogrammbereich aus.

Die Funktion der Ionenquelle besteht darin, aus den neutralen Molekülen oder Elementen des Analytgemisches in der Gasphase isolierte Ionen zu erzeugen und diese zum Analysator hin zu beschleunigen.

Zur Ionisierung nutzt man Elektronen, Ionen, Moleküle und Photonen sowie thermische oder elektrische Energie. Ionenquelle und Einlass-System bilden oft eine Einheit. Je nach Analysatortyp und Ionisierungsmethode können die Anforderungen

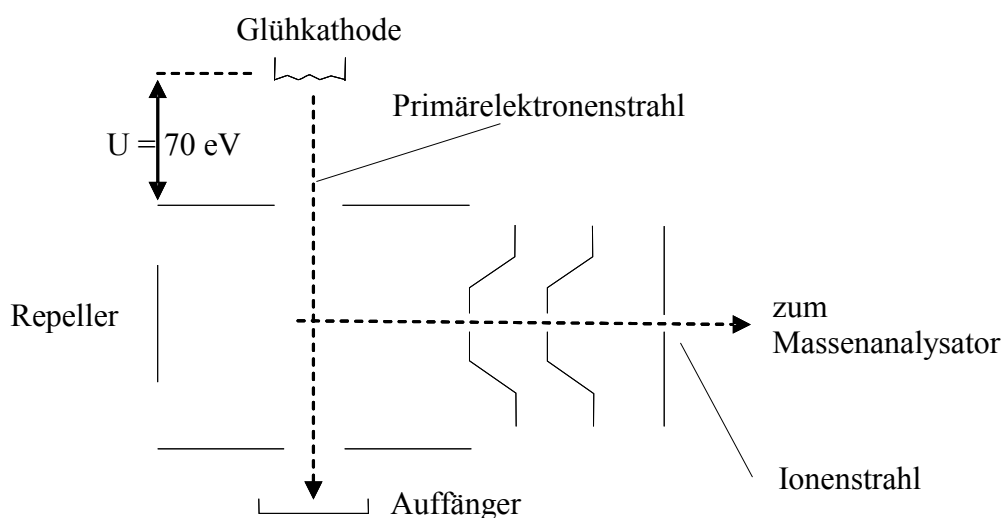
an diese Baugruppe stark variieren. Das erhaltene Massenspektrum hängt stark von der Art der gebildeten Ionen und damit von der Ionisierungsart ab.

Im Falle der EI-Ionenquelle erzeugt ein Filament aus Wolframdraht die zur Ionisierung benötigten Elektronen. Diese werden senkrecht zum Probeneintrag bewegt.

In einem GC/MS- System (GC/EI-MS), wie es in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, gelangen die Substanzen mit dem Trägergasstrom aus der GC-Säule in das vom Elektronenstrahl durchquerte Ionisationsvolumen. Im Schnittpunkt der beiden Strahlen findet die Ionisierung statt. Die Ionisierungswahrscheinlichkeit liegt bei nur  $10^{-3}$ – $10^{-5}$ , trotzdem ist EI eine Technik mit sehr guter Empfindlichkeit. Nicht ionisierte oder durch Wandstöße neutralisierte Teilchen werden von einem leistungsstarken Vakuumsystem abgepumpt. Der Repeller verbessert die Extraktion der Ionen aus der Ionenquelle. An deren Ausgang erhält man im Wesentlichen positive Ionen, die anschließend zum Massenfilter hin beschleunigt werden.

Dazu wird über ein elektrisches Linsensystem mit mehreren Blenden eine Beschleunigungsspannung angelegt, mit der gleichzeitig eine Fokussierung des Ionenstrahls erreicht wird (vgl. Abb. 2.5).

Die Bildung der Ionen hängt stark von der Kollisionsenergie der Elektronen ab. Bei einer Energie von 70 eV bilden sich die meisten Fragmente und man erhält aussagekräftige Massenspektren. Wählt man niedrigere Energien, bilden sich verstärkt die unfragmentierten Molekülionen, während höhere Energien zur Bildung sehr kleiner Ionen führen.



**Abbildung 2.5:** Schema einer EI-Ionenquelle. Der neutrale Molekülstrahl tritt senkrecht zur Papierebene in die Quelle ein. Modifiziert aus [Schröder 1991]



Generell werden Massenspektrometer nach ihrem Analysator bezeichnet, d. h. nach den verschiedenen Methoden zur Ionentrennung nach  $m/z$ . Man unterscheidet in diesem Zusammenhang zum einen Sektorfeldgeräte, die mit Hilfe von magnetischen (B) und elektrischen (E) Feldern senkrecht zur Flugrichtung der Ionen in verschiedenen Anordnungen (B, BE, EB, EBE, EBEB, BEBE, ...) eine hochauflösende Massenselektion ermöglichen und zum anderen Quadrupolgeräte mit geringerer Massenauflösung, die durch Überlagerung zeitlich konstanter und hochfrequenter elektrischer Quadrupolfelder in linearen Quadrupolen die Auftrennung der Massen realisieren (Q, QqQ; Q: Massentrennung, q: nur fokussierende Wirkung).

Darüber hinaus gibt es Dreidimensionale Quadrupol-Ionenfallen (Ion-Trap, QIT, Quistor), bei denen die Überlagerung der hochfrequenten Quadrupolfelder in einer Paul-Falle stattfindet (s. Abb. 2.6 S. 30). Diese Technik erlaubt die Speicherung der Ionen und ermöglicht mehrdimensionale Massenspektrometrie (MS/MS,  $MS^n$ ), da Produkte der primären Fragmentierung erneut untersucht werden können. Ein analoges Vorgehen ist mit linearen Quadrupol-Ionenfallen (LIT) in einem axial segmentierten linearen Quadrupol möglich.

Die höchste Massenauflösung ist derzeit mit Ionencyclotronresonanzgeräten (ICR) zu erreichen. Die elektrische Anregung findet hier in sehr starken Magnetfeldern (3-7 T) statt, die die Bestimmung der Cyclotronresonanzfrequenz erlauben. Diese Geräte sind heute ausschließlich in der Fourier Transform-Version (FT-ICR) im Einsatz und ermöglichen ebenfalls die Speicherung der Ionen zur Durchführung von Produktscans. Eine weitere Möglichkeit der Massenselektion nutzen Flugzeitgeräte (TOF), die zur Bestimmung der Flugzeit (time-of-flight) der Ionen eine gepulste Ionenzufuhr benötigen. Sogenannte Hybridgeräte kombinieren verschiedene Analysatoren für MS/MS-Anwendungen (BEqQ, BEtrap, EBE-TOF, QqTOF, QqLIT, ...)

Das in dieser Arbeit verwendete Gerät besitzt einen linearen Quadrupol-Massenfilter, wie er auch für die ICP-MS eingesetzt wird und dessen Funktionsweise daher bereits in dem entsprechenden Kapitel beschrieben wurde (s. Kap. 2.2.2 S. 19).

Im Vorfeld der Beschaffung bestand die Überlegung ein Ion-Trap Gerät zu verwenden. Die durchgeführten Applikationstests sind im Kap. 3.2.1 S. 41 beschrieben. Demzufolge soll an dieser Stelle kurz die prinzipielle Funktionsweise

dieses alternativen Massenfilters beschrieben werden.

In der Ionenfalle, die nach ihrem Erfinder auch Paul-Falle genannt wird, herrscht ebenfalls ein elektrisches Quadrupolfeld. Das Feld wird durch zwei übereinanderliegenden geerdeten Polkappen und einer zwischenliegenden, isoliert angebrachten Ringelektrode erzeugt (s. Abb. 3). Die obere Polkappe enthält zwei Glühkathoden (Filamente), die untere den Ionendetektor (Multiplier). Zur Erzeugung eines Massenspektrums werden während der Ionisierungsphase durch Elektronenstoß die gebildeten Fragmentionen durch ein HF-Feld der Ringelektrode gespeichert ("getrappt"). Während der Scanphase werden durch kontinuierliche Änderung der HF-Amplitude Ionen bestimmter Masse nacheinander auf den Ionendetektor gelenkt. Durch Korrelation der HF-Scanrampe mit dem Ausgangssignal des Multipliers erhält man das Massenspektrum der analysierten Verbindung. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich einzelne Fragmentionen selektieren und nach erneuter Fragmentierung dieses Vorläuferions (parent ion) in Tochterionen (daughter ion) auf dessen Struktur untersuchen. Man nennt diese Technik MS/MS oder  $MS^2$ .

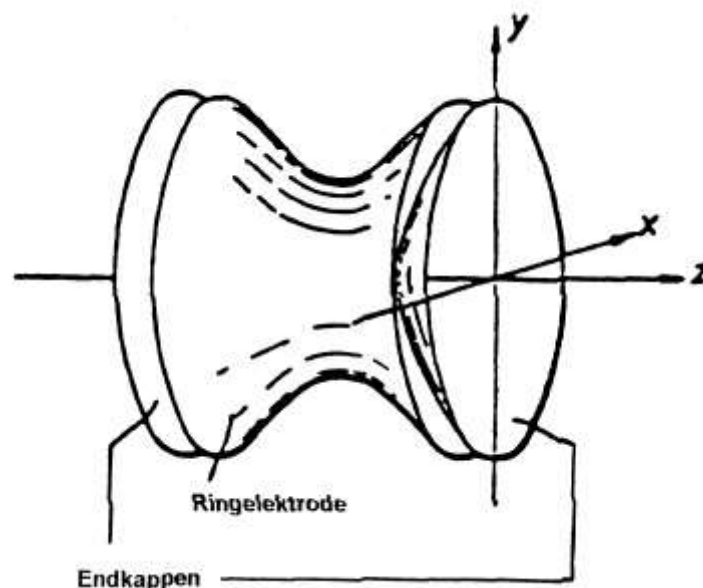


Abbildung 2.6: schematische Darstellung einer Quadrupol Ionenfalle (Ion-Trap) nach dem Vorbild der Paul-Falle [Schröder 1991]

Neuere Geräte besitzen eine externe Ionenquelle, die der Falle vorgelagert ist. Das hat zur Folge, dass die Ionisierung nicht innerhalb der Quelle stattfindet. Diese Modelle unterscheiden sich in der Komplexität und der Skalierbarkeit der Abläufe von Systemen mit interner Ionisierung; die Spektren ähneln dadurch mehr denen, die mit der EI-MS-Technik erhalten werden.

Im Fall der oben beschriebenen internen Ionisierung wird zunächst das Probenspektrum in der Ion-Trap erzeugt und gespeichert. Anschließend findet die Selektion des Vorläuferions statt.

Ion-Trap-Systeme mit externer Ionisierung können bereits während des Transfers der Ionen aus der Ionenquelle ein Frequenzmuster zur Isolation des Vorläuferions einsetzen. Auf diese Weise ist eine längere Speicherphase bzw. schnellere Abtastrate im MS/MS-Modus für die GC/MS realisierbar. Weiterhin ermöglichen Geräte mit externer Ionenquelle eine Kalibrierung der Frequenzskala. Hierdurch kann der MS/MS-Betrieb analog dem SIM-Modus erfolgen, indem lediglich die Angabe der Masse des gewünschten Vorläuferions erforderlich ist. In anderen Fällen ist eine empirische Ermittlung von Anregungsfrequenzen erforderlich.

Ein entscheidender Nachteil der Systeme mit interner Ionisierung ist auch die starke Konzentrationsabhängigkeit der Spektren durch Ionen-Molekülreaktionen, die zu Auto-CI-Effekten mit  $M+1$  Peaks führen können sowie der geringere dynamische Bereich. Durch die externe Ionenquelle wurden diese nachteiligen Effekte weitgehend eliminiert, da Neutralteilchen nicht mehr in den Analysator geraten können.

Die erreichbare Massenauflösung ist in etwa so groß wie die von Quadrupol-Massenpektrometern.

## **2.3 Einsatz von GC, ICP-MS und EI-MS in der Elementspeziation**

### **2.3.1 Vor- und Nachteile gegenüber alternativen Techniken**

#### ♦ *Chromatographie*

Um die Gefahr der artifiziellen Veränderung der Speziesverteilung zu minimieren, ist es wünschenswert, die Probe direkt und ohne vorhergehende Arbeitsschritte zu analysieren. Mit der HPLC Technik ist dieses für Spezies, die in flüssigen oder festen Proben vorliegen, in vielen Fällen möglich, da häufig eine direkte Injektion der verdünnten Matrix oder wässriger Extrakte durchgeführt werden kann.

Bei gaschromatographischer Separation hingegen ist die Abtrennung der Matrix und die Überführung der Analyten in die Gasphase unumgänglich. Hierzu wird häufig ein Derivatisierungsschritt vorgeschaltet und in dessen Folge die Abtrennung der derivatisierten Analyten von der Matrix über Extraktion in ein organisches Lösungsmittel oder mit Hilfe eines Spülgasstroms durch gas/flüssig Separation vorgenommen.

Diese zusätzlichen Arbeitsschritte bei Verwendung der GC bergen die Gefahr der Bildung von Artefakten und Beeinflussung der Speziesverteilung. Diese Nachteile müssen im Einzelfall gegen die Vorteile abgewogen werden, die diese Technik im Vergleich mit der HPLC vor allem hinsichtlich der überlegenen Trennleistung und der Nachweisstärke besitzt. Eine Folge dieses Defizites ist, dass in der HPLC für eine individuelle Trennproblematik sehr spezifische Parameter gefunden werden müssen. Dieses schränkt das mit einer Methode analysierbare Speziesspektrum stark ein und Multielementmethoden sind in der Regel nicht möglich. Darüber hinaus sind die gaschromatographischen Techniken den flüssigkeitschromatographischen hinsichtlich der Empfindlichkeit überlegen, da die Menge an störender Hintergrundmatrix hier deutlich kleiner ist. Bei der Kopplung der HPLC an die ICP-MS verstärkt sich dieses Sensitivitätsproblem, da bei der Zudosierung flüssiger Proben nur ca. 5% der zugeführten Menge als feines Aerosol den Detektor erreichen. Eine Verbesserung der Nachweisgrenzen durch Steigerung des Anteils feinsten Tröpfchen kann mit Hilfe von Ultraschallzerstäubern erreicht werden. Der Efflux des GC gelangt hingegen vollständig in das Plasma und schließlich zum Detektor.

Die Kapillarelektrophorese konnte sich aufgrund der geringen Kapazität trotz ihres

hohen Auflösungsvermögens bisher bei der Analyse von Realproben nicht durchsetzen.

♦ *Detektion*

Die Detektion der Elementmassen mittels ICP-MS zeichnet sich, wie einleitend erwähnt, gegenüber der AAS durch eine ausgeprägte Multielementfähigkeit aus und besitzt im Vergleich zur AES um einige Größenordnungen erniedrigte Nachweisgrenzen. Durch die hohe Energie, die das Plasma im Überschuss bereitstellt, wird aufgrund der effizienten Ionisierung neben der hohen Empfindlichkeit eine exzellente Linearität erreicht und ein Detektionssignal erzeugt, das nur geringfügig von der Natur der ionisierten Verbindung abhängt. Letzteres ermöglicht eine speziesunspezifische Quantifizierung und ist vor allem dann vorteilhaft, wenn keine stabilen Standards für eine speziesspezifische Kalibration zur Verfügung stehen.

Ein weiterer Vorteil des ICP-MS Detektors ist die Möglichkeit zwischen den verschiedenen Isotopen eines Elementes zu differenzieren. Die Bestimmung von Isotopenverhältnissen oder hochpräzise Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalyse sind somit durchführbar.

Die Stärke der ICP-MS stellt allerdings unter einem anderen Blickwinkel auch eine Schwäche dieser Technik dar.

Denn durch die vollständige Zerlegung der Verbindung im Plasma geht auch mit dem Verlust jeglicher Strukturinformation einher.

Zur Identifikation und Verifizierung molekularer Strukturen werden daher massenspektrometrische Verfahren wie die EI-MS nach GC Trennung oder die ESI-MS in Verbindung mit der HPLC eingesetzt.

Trotz großer Fortschritte vor allem im Bereich der Empfindlichkeit, die den Einsatz dieser Techniken für die Elementspeziation erst möglich gemacht haben, bringt die Detektion eines breiten Massenspektrums, wie es für die Aufklärung einer Molekülstruktur notwendig ist, den Nachteil einer verringerten Nachweisgrenze mit sich.

### 2.3.2 Stand der Forschung

Mit Bezug zur vorgestellten Kopplungsmethode sollen hier schwerpunktmäßig aktuelle instrumentelle Entwicklungen und Anwendungsmöglichkeiten von GC/EI-MS und GC/ICP-MS im Bereich der Elementspeziation sowie die dazu erforderlichen Techniken zur Probenaufgabe behandelt werden.

Auch der Probenpräparation muss in der Elementspeziation eine erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt werden, da die Lagerung der Probe und die Auswahl der Extraktionstechniken einen maßgeblichen Einfluss auf die Integrität der Probe haben. Der oben erwähnten Schwerpunktsetzung folgend, wird jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf weitere Ausführungen zu diesem Themenkomplex verzichtet und auf die entsprechende Literatur (z.B. [Szpunar et al. 2000]) verwiesen.

#### ♦ *Probenaufgabe*

Hinsichtlich der Aufgabe flüchtiger Elementspezies vor der gaschromatographischen Trennung gibt es unterschiedliche Ansätze:

Bei der Purge & Trap-Technik werden bereits flüchtige oder nach Derivatisierung flüchtige Verbindungen mit einem Trägergasstrom aus einer Flüssigkeit oder dem darüber befindlichen Gasraum (Headspace) gespült (gepurged). Die Analyten werden in einer Kühlfalle (Trap) einkondensiert und durch schlagartiges Aufheizen desorbiert. Allerdings stößt diese Technik bei schwerer flüchtigen Verbindungen an ihre Grenzen, da hier die Effizienz der gas/flüssig Separation limitiert ist.

Durch Hydrierung der Spezies mittels Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) lässt sich dieses Problem umgehen, da die derivatisierten Verbindungen in ihrer überwiegenden Mehrheit leicht flüchtig sind. Mit dieser Technik sind prinzipiell alle Spezies der hydridbildenden Elemente zugänglich und können aufgrund der hohen Effizienz der Hydrierungsreaktion und der umfassenden Matrixabtrennung mit sehr niedrigen Nachweisgrenzen detektiert werden. In Kombination mit einem Multielementdetektor wie der ICP-MS eignet sich diese Methode hervorragend für semiquantitative Screening-Analysen in einer Vielzahl umweltrelevanter Matrices [Grüter et al. 2000].

Aufgrund des heftigen und unspezifischen Reaktionsverlaufes und aufgrund von stark reduzierenden Verhältnissen ist die Hydriergenerierung mit der Zielsetzung präzise, quantitative Ergebnisse zu produzieren und den Erhalt der Speziesintegrität zu gewährleisten nur dann geeignet, wenn sie unter kontrollierten und reproduzierbar

gesteuerten Bedingungen stattfindet. Dies gelingt beispielsweise durch Anwendung einer automatisierten pH Gradienten Methode [Diaz-Bone 2006]. Zudem ist die Absicherung der analysierten Derivatisierungsprodukte mit strukturaufklärenden Methoden zur qualitativen Validierung notwendig, um Fehlinterpretationen durch Derivatisierungsartefakte zu vermeiden. Letzteres gilt allgemein für Derivatisierungsreaktionen. Im Falle der wesentlich selektiveren Ethylierung mit Natriumtetraethylborat (NaTeEB) findet die Umsetzung allerdings unter milderen und daher reproduzierbareren Bedingungen statt [Martin und Donard 1995]. Deshalb ist aber auch die Effizienz dieser Reaktion niedriger und dementsprechend die Empfindlichkeit dieser Methode geringer. Zudem sind, wie eigene Vorarbeiten zeigen konnten [Kösters 2002], aufgrund der geringeren Flüchtigkeit der Ethylderivate und der dadurch abnehmenden Effizienz der gas/flüssig Separation Purge & Trap Anwendungen nach Ethylierung stärker limitiert als nach Hydridgenerierung.

Daher wird von verschiedenen Arbeitsgruppen die Ethylierung der Analyten mit nachfolgender Extraktion in ein organisches Lösemittel angewendet, welches anschließend in das GC injiziert wird [Tu et al. 2000], [Roudrigez-Gonzales et al. 2002], [Ohno et al. 2002]. Insbesondere für die Speziierung von schwerer flüchtigen Organozinnverbindungen wird diese Methodik häufig eingesetzt, da hier die Gefahr des Analytverlustes durch Verdampfung minimal ist.

Die Technik der Ethylierung wird auch für die Speziierung von Quecksilber- und Bleiverbindungen angewendet [Prange und Jantzen 1995], [Krupp et al. 2001], [Lambertson 2001]. Als weitere Derivatisierungsmethode findet die Propylierung mit Natriumpropylborat (NaTePB) Verwendung [Demuth und Heumann 2001], [Glindemann et al. 2002]. Hiermit lassen sich unter anderem Ethylderivate nachweisen, die bei der Ethylierung naturgemäß nicht erkannt werden können. Die Siedepunkte der Propylderivate sind entsprechend höher als die der Ethylverbindungen

#### ♦ *Instrumentelle Entwicklungen und Anwendungen*

Zur Kopplung des GC an ein ICP-MS wurden speziell für solche hoch siedenden Verbindungen leistungsfähige Transferleitungen entwickelt, die mit Hilfe von zusätzlichen Trägergasflüssen (Make-up-Strom) die Überführung zum Detektor bei moderaten Temperaturen ermöglichen [Bayon et al. 1999], [De Smaele et al. 2001],

[Glindemann et al. 2002]. Bei den handelsüblichen GC/EI-MS Kopplungen ist der Transfer von der Säule zur Ionenquelle unkritisch und durch direkte Einschraubung der Säule in eine kurze, separat beheizte Transferleitung gelöst.

Von wachsender Bedeutung für die Speziierung sind organometallische Spezies, die mit stabilen Isotopen markiert sind [Bouyssiere et al. 2002]. Solche isotopenangereicherten Standards werden zum einen zur Aufdeckung von Fehlerquellen während des analytischen Prozesses eingesetzt [Snell et al. 2000], [Lambertson 2001], [Demuth und Heumann 2001] zum anderen ermöglichen sie mit Hilfe der Isotopen-Verdünnungsmethode (isotope dilution) präzise quantitative Analysen [Gallus und Heumann 1996], [Krupp et al. 2001].

Isobare Interferenzen durch verschiedene Molekülionen, die sich unter den extremen Bedingungen des Plasmas bilden, sind die Hauptursache für Einschränkungen des mittels ICP-MS analysierbaren Elementspektrums.

Zwei wesentliche instrumentelle Entwicklungen, die unterschiedliche Ansätze bei der Umgehung dieser Problematik repräsentieren, sind in diesem Zusammenhang zu nennen.

Zum einen konnte die Empfindlichkeit sowie vor allem die Routinetauglichkeit hochauflösender Sektorfeldgeräte (HR-ICP-MS) soweit verbessert werden, dass der Einsatz in Kopplung mit chromatographischen Methoden möglich ist [Edler et al. 2002]. Diese Geräte vermögen aufgrund ihrer hohen Massenauflösung zwischen Molekülionen und Elementen zu unterscheiden, auch wenn die Massen dieser Teilchen sich erst in der dritten oder vierten Nachkommastelle unterscheiden.

Ein anderer Weg wird mit der Kollisions-/Reaktionszelle (RC/CC-ICP-MS) beschritten, die dem herkömmlichen Quadrupol-Massenfilter vorgeschaltet wird. Die Interferenzen können dann durch Einleiten eines Reaktionsgases (z.B.  $H_2$ ,  $NH_4$ ) über selektive Reaktionen auf eine andere Masse verlagert werden oder nach Kollision mit einem nicht reaktiven Gas (z.B. He) mit Hilfe einer Potentialbarriere eliminiert werden. Letzteres ist möglich, da die interferierenden Moleküle aufgrund ihres größeren Durchmessers häufiger kollidieren und ihre verbleibende kinetische Energie nicht ausreicht um die Potentialbarriere zu überwinden.

Bei der Untersuchung von Realproben findet man auch in der aktuellen Literatur immer wieder das Problem, dass Spezies nicht identifiziert werden können bzw. Referenzstandards fehlen, die über Retentionszeitvergleich eventuelle Vermutungen



bezüglich der Struktur bestätigen könnten [Kresimon et al. 2001], [Pavageau et al. 2002]. Mit der wachsenden Leistungsfähigkeit der analytischen Methoden hinsichtlich Nachweisstärke und Auflösungsvermögen, sowie der Verlagerung zu biologisch-medizinischen Proben zur Erforschung der Auswirkungen auf den Menschen, ist zu erwarten, dass dieses Problem noch an Bedeutung zunehmen wird.

Wie in verschiedenen Arbeiten bereits gezeigt wurde, kann diesbezüglich der Einsatz der GC/MS, analog zur Entwicklung der HPLC/ESI-MS bei der Untersuchung von flüssigen Proben [Feldmann 2005], einen wichtigen Beitrag zur Strukturanalytik und Identifikation metall(oid)organischer Verbindungen leisten [Chen et al. 2001], [Montes-Bayon et al. 2002], [Smith et al. 2002], [Tsunoi et al. 2002], [Kösters et al. 2003].

### **2.3.3 Motivation und Ziel der Arbeit**

Diese Arbeit ist thematisch in die Tätigkeit einer Forschergruppe eingebunden, die sich schwerpunktmäßig mit der Untersuchung mikrobiologischer sowie humanbiologischer und anderer umweltrelevanter Systeme hinsichtlich der Toxizität und der Metabolisierung metall(oid)organischer Verbindungen befasst.

Die Vielzahl der in mikrobiologischen sowie humanbiologischen Matrices zu erwartenden neuen und unbekannten Spezies war neben dem häufigen Auftreten unbekannter Peaks bei der Messung von Umweltproben mittels GC/ICP-MS eine wichtige Motivation für die Entwicklung einer Methode zur simultanen Erfassung elementspezifischer und molekülspezifischer Informationen.

Insbesondere bei flüchtigen beziehungsweise nach Derivatisierung volatilen Verbindungen macht jedoch die einleitend erwähnte Problematik fehlender Standards oder nicht bekannter Siedepunkte die Zuordnung der Substanzen häufig unmöglich. Und in den Fällen, in denen diese indirekte Identifikation über die Retentionszeiten möglich ist, besteht die zusätzliche Unsicherheit bei der qualitativen Interpretation der Ergebnisse da die Koelution unterschiedlicher Verbindungen nicht ausgeschlossen werden kann.

Um unter diesen Voraussetzungen eine zuverlässige, routinemäßige Identifikation und Verifizierung bekannter und unbekannter Spezies gewährleisten zu können, erschien daher die Integration strukturaufklärender Methoden zusätzlich zur bisher verwendeten GC/ICP-MS Analytik dringend erforderlich.

Betrachtet man die gegebenen instrumentellen Möglichkeiten, wie sie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert wurden, stellen sich ICP-MS und EI-MS als komplementäre Detektionstechniken dar, deren paralleler Einsatz als Erweiterung der GC/ICP-MS Kopplung sich gleichsam aufdrängt.

Die grundsätzliche Frage nach der technischen Realisierbarkeit eines solchen Systems sowie die zu erwartenden Vorteile durch die kombinierte Anwendung dieser Techniken für die aktuelle Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe, gaben somit den Anstoß für die vorliegende Dissertation.

Ziel dieser Arbeit war es dementsprechend die parallele Detektion volatiler Elementspezies mittels EI-MS und ICP-MS nach gaschromatographischer Trennung (GC/EI-MS/ICP-MS) durch die Kopplung entsprechender Instrumente technisch umzusetzen, um sowohl eine nachweisstarke quantitative Analyse als auch eine direkte qualitative Identifizierung dieser Verbindungen zu ermöglichen.

Darüber hinaus wurde angestrebt durch eine Validierung der analytischen und chromatographischen Rahmenparameter die Funktionsfähigkeit des Systems zu belegen und diese nach Möglichkeit in der praktischen Anwendung der Methode zu bestätigen.

## 3 Analytischer Teil

### 3.1 Experimentelles

#### ♦ *Verwendete Instrumente und Datenverarbeitung*

Als gaschromatographisches System wurde der GC 6890 N (Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Die Auswahl der zur Probenaufgabe eingesetzten Geräte und der chromatographischen Parameter waren zum Teil Gegenstand dieser Arbeit. Sie werden daher im Zusammenhang mit den entsprechenden Experimenten diskutiert und dort benannt. (s. Kap. 3.3 S. 63 ff. und Tab. 3.10 S.71).

Zur simultanen Detektion wurden ein 5973 N MSD (Agilent Technologies, Waldbronn) und ein 7500a ICP-MS (Agilent Technologies, Waldbronn) eingesetzt. Die hierfür verwendeten Parameter sind in Tab. 3.4 S.54 aufgelistet. Zur Steuerung der Geräte kamen die Programme MSD ChemStation (Rev. D.01.00, 2003 Agilent Technologies, Waldbronn) bzw. ICP-MS ChemStation (Rev. B.01.00, 2001 Agilent Technologies, Waldbronn) zum Einsatz. Die Auswertung der massenspektrometrischen EI-MS Daten wurde soweit nicht anders aufgeführt mit Hilfe der zugehörigen Software (Enhanced Data Analysis) und der integrierten Spektrenbibliothek (NIST v.2.0) durchgeführt. Die zeitaufgelösten ICP-MS und EI-MS Daten wurden in ein geeignetes Datenformat (CSV) exportiert und mit Hilfe von Microcal Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, USA) integriert. Sofern nicht anders gekennzeichnet wurde dieses Programm auch zur Darstellung der Chromatogramme verwendet. Die Auswertung der integrierten Daten und Erstellung der Kalibrationsgeraden wurde mit Excel (Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt.

#### ♦ *Verwendete Chemikalien und Reagenzien*

Zum Ansetzen der wässrigen Standards, für Purge & Trap Versuche sowie die Reinigung der benutzten Glasgeräte wurde ausschließlich deionisiertes Wasser verwendet. Dazu wurde VE (vollentsalztes) Wasser mit einer entsprechenden Reinstwasseranlage (Seralpur Pro 90 CN, Elga-Seral, Ransbach-Baumbach) aufgereinigt. Als Derivatisierungsreagenzien kamen Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ , Acros Organics, Geel, Belgien) bzw. Natriumtetraethylborat ( $\text{NaTeEB}$ ) zum Einsatz. Zur

Anpassung des pH-Wertes wurde, falls nicht anderweitig beschrieben, Salzsäure (HCl, 30 % Suprapur, Merck, Darmstadt) bzw. Citratpuffer (pH 5, Certipur, Merck, Darmstadt) eingesetzt. Für die Gasversorgung des GC wurde Helium von hoher Reinheit ( $> 5.0$ ) aus Zylindern mit eingebauten Reinigungssystem benutzt (BIP<sup>TM</sup>, Air Products, Hattingen), um den Luft- und Wassergehalt im System zu minimieren. Das Plasma des ICP-MS wurde mit Argon betrieben (Reinh. 4.6, Air liquide, Düsseldorf)

In den, im analytischen Teil beschriebenen Versuchen (Kap. 3.2 S. 41 ff. und Kap. 3.3 S.63), wurden darüber hinaus folgende Reagenzien verwendet:

Für die wässrigen Arsenstandards:

Monomethylarsonsäure ( $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ , MMAs(V)): TRI Chemical, Yamanshi, Japan

Dimethylarsinsäure ( $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ , DMAs(V)): Strem, Kehl

Trimethylarsenoxid ( $(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$ ) TMAOs: Strem, Kehl

Für die Iodalkanstandards (und deren Verdünnungen):

n-Dekan ( $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ ): Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

n-Oktanol ( $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$ ) Fluka, Buchs SG, Schweiz

Iodmethan, Reinh.  $> 99.5\%$  ( $\text{CH}_3\text{I}$ ): Fluka, Buchs SG, Schweiz

Iodethan, Reinh.  $> 98\%$  ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{I}$ ): Fluka, Buchs SG, Schweiz

1-Iodpropan, Reinh.  $> 98\%$  ( $\text{C}_3\text{H}_9\text{I}$ ): Fluka, Buchs SG, Schweiz

2-Iodpropan, Reinh.  $> 98\%$  ( $\text{C}_3\text{H}_9\text{I}$ ): Fluka, Buchs SG, Schweiz

Chemikalien, Materialien und Geräte, die im Zusammenhang mit den in Kapitel 4 (S. 77 ff.) beschriebenen Anwendungen verwendet wurden, sind dort separat benannt.

## 3.2 Entwicklung der GC/ICP-MS/EI-MS Gerätekopplung

### 3.2.1 Vorüberlegungen und Geräteauswahl

Die Frage, ob eine mehrfache Fragmentierung der Ionen mittels eines Ion-Trap Systems erforderlich ist, um die Struktur der zu untersuchenden Verbindungen aufklären zu können, oder ob ein Gerät mit einem Quadrupol zur Massenselektion diesen Anforderungen genügt, ließ sich auf theoretischer Ebene nicht klären.

Daher wurden zunächst Test der verschiedenen Gerätetypen in den Applikations-Laboratorien der jeweiligen Herstellerfirmen durchgeführt.

- *Test eines Quadrupol Gerätes (MSD 5973N, Agilent Technologies)*

In einem Reaktionsgefäß wurden Kompostproben bzw. Standardlösungen (MMAs(V) DMAs(V), TMAOs) mit ca. 40 mL deionisiertem Wasser und 1-2 mL HCl (3% w/w) versetzt und mit einem Magnetrührer homogenisiert. Über ein Septum wurden 1-2 mL des Derivatisierungsmittels NaBH<sub>4</sub> (ca. 5% w/w) zugegeben. Die nach dieser Hydrierung flüchtigen Analyten wurden mit einem Heliumstrom von ca. 100 mL/Min bei Raumtemperatur auf eine Tenaxfalle gespült. In einem „Unity“ Thermodesorber (Markes, Lantrisant, UK) wurden die Röhrchen desorbiert und über eine geheizte Transferleitung in das MSD 5973N überführt. Weitere Details zu diesem Test wurden an anderer Stelle veröffentlicht [Kösters et al. 2003]. Aufgrund der beschriebenen Art der Probenaufgabe und des breiten Siedepunktspektrums der zu untersuchenden Spezies mussten Kompromisse hinsichtlich der Trapeffizienz gemacht werden. Daher kann nicht von einer quantitativen Überführung gesprochen werden. Für diese rein qualitativen Testuntersuchungen jedoch, in deren Mittelpunkt die Identifizierung verschiedener Arsenspezies stand, war dieses System gut geeignet.

- *Test eines Ion-Trap-Gerätes (Polaris Q, Thermo Finigan))*

Die Derivatisierung der gleichen Kompostproben wurde durchgeführt wie oben bereits beschrieben. Für die Probenaufgabe wurde ein für unsere Zwecke modifiziertes Purge & Trap Gerät verwendet, bei dem die Analyten aus unserem Derivatisierungsgefäß auf eine Kapillarkühlfalle (-120°C) überführt wurden. Aufgrund der großen Restriktion dieses Aufbaus musste der Heliumstrom während der Hydridgenerierung über ein Ventil ausgeschaltet werden. Erst nach Abklingen der

Wasserstoffproduktion wurde der Purgegasfluss wieder zugeleitet. Auch dieses System ist nicht ideal, wie sich vor allem beim Einkondensieren CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre einer mikrobiologischen Probe zeigte: Schon nach wenigen Minuten war die Kühlfalle zugefroren und der Versuch musste abgebrochen werden. Auch hier reichte die Kombination aus Adsorptionsvermögen und Kühlung nicht, um sämtliche interessierenden Verbindungen quantitativ festzuhalten. Für die Zwecke einer qualitativen Testmessung war aber auch dieses System zufriedenstellend.

• *Resultate des Gerätetests mit dem Quadrupol System*

Die folgende Tabelle 3.1 zeigt die mit dem Quadrupol System gefundenen und größtenteils identifizierten Verbindungen.

Tabelle 3.1 Mit dem Quadrupol System MSD 5973N (Agilent Technologies) identifizierte Verbindungen.

RT <sub>EI-MS</sub> [Min]	Vermutete Verbindung	Beleg
<b>As</b>		
1,62	Monomethylarsin (MMAsH <sub>2</sub> )	Bibliotheksspektrum <sup>a)</sup> (s. Abb. 8.1 S. 135)
2,36	Dimethylarsin (DMAsH)	Bibliotheksspektrum <sup>a)</sup> (s. Abb. 8.1 S. 135)
2,99	Trimethylarsen (TMAs)	Bibliotheksspektrum <sup>a)</sup> (s. Abb. 8.1 S. 135)
3,06	Evtl. As-Verb.	-
4,44	Diarsin (As <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	Zuordnung der Fragmentionen [Kösters et al. 2003]
5,74	Dimethylchloroarsen (DMAsCl)	Bibliotheksspektrum (s. Abb. 8.1 S. 135)
6,14	Monomethyldiarsin (MMAs <sub>2</sub> H <sub>3</sub> )	Zuordnung der Fragmentionen [Kösters et al. 2003]
8,56	Dimethylmethylthioarsen (DMAsSM)	Zuordnung der Fragmentionen [Kösters et al. 2003]
12,2	Evtl. Dimethylarsenverb.	m/z 75,89 und 105 vorhanden
13,6	Evtl. Dimethylarsenverb.	m/z 75,89 und 105 vorhanden
13,7	Evtl. Dimethylarsenverb.	m/z 75,89 und 105 vorhanden
<b>Sn</b>		
1,36	Stanan (SnH <sub>4</sub> )	Zuordnung der Fragmentionen (s. Abb. 8.2 S. 136 A))
2,08	Monomethylzinnhydrid (MMSnH <sub>3</sub> )	Zuordnung der Fragmentionen (s. Abb. 8.2 S. 136 B))
3,13	Dimethylzinnhydrid (DMSnH <sub>2</sub> )	Zuordnung der Fragmentionen (s. Abb. 8.2 S. 136 C))
5,36	Monobutylzinnhydrid (MBSnH <sub>3</sub> )	Zuordnung der Fragmentionen (s. Abb. 8.2 S. 136 D)) + CI Spektrum [Kösters et al. 2003]
<b>Sb</b>		
3,36	Dimethylantimonhydrid (DMSbH)	Zuordnung der Fragmentionen [Daten nicht gezeigt]
4,25	Trimethylantimon (TMSb)	Bibliotheksspektrum <sup>a)</sup> (s. Abb. 8.1 S. 135)
<b>Te</b>		
4,86	Dimethyltellur (DMTe)	Zuordnung der Fragmentionen [Kösters et al. 2003]

<sup>a)</sup> Wiley

Aus diesen Auflistungen geht hervor, dass die MSD 5973N von Agilent mit einem Quadrupol-MS in der Lage war, eine Vielzahl metall(oid)organischer Verbindungen zu detektieren. Während sich einige der Verbindungen sogar durch Massenspektren aus der Datenbank absichern ließen (Monomethylarsin, Dimethylarsin,

Trimethylarsen, Dimethylchloroarsin, Trimethylantimon s. Abb. 8.1 S. 135), lieferten andere Verbindungen relativ eindeutige Fragmentmuster, die sehr gute Rückschlüsse auf die Struktur der Spezies zulassen (z.B. Diarsin, Methyl-diarsin, Dimethylmethylthioarsen, Dimethyltellur s. Abb. 8.3 S. 137). Wichtige Hinweise geben hier auch die natürlichen Isotopenverteilungen verschiedener Elemente. Insbesondere war die MSD 5973N in der Lage erstmalig das Diarsin und das Dimethylchloroarsin zweifelsfrei zu identifizieren, welche ebenso wie das Dimethylmethylthioarsen noch nicht in Umweltproben beschrieben worden sind.

Einige Peaks konnten anhand der Fragmente nicht eindeutig Metall(oid)-verbindungen zugeordnet werden. Da aber bei der angestrebten Kopplung die ICP-MS als elementspezifischer Detektor zur Verfügung steht, kann mit Hilfe der zusätzlichen Information über die Elemente, die zu der jeweiligen Retentionszeit den Detektor erreichen, eine Identifizierung auch dieser Verbindungen vereinfacht bzw. ermöglicht werden.

- *Resultate des Gerätetests mit einem Ion-Trap System*

Tabelle 3.2 zeigt die mit dem Ion-Trap-System PolarisQ (Thermo Finnigan®) gefundenen und zum Teil identifizierten Verbindungen.

Die Messungen mit dem Ion-Trap-Gerät Polaris Q von Thermo Finnigan konnten zumindest bestätigen, dass dieses System Dank der externen Ionisierung konzentrationsunabhängige Fragmentmuster lieferte, die denen in den Quadrupol-Spektren sehr ähnlich waren.

Der Vergleich der Gesamtchromatogramme war aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen in Probenaufgabe und Chromatographie wenig aussagekräftig. Beim direkten Vergleich der Massenspektren am Beispiel des Trimethylantimons (Abb. 8.1 S. 135 und Abb. 8.5 S. 138) zeigte sich beim Ion-Trap Gerät ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis. Dieses wurde auch in der Tatsache deutlich, dass insgesamt weniger Spektren aus dem Hintergrund der Matrixsignale isoliert werden konnten, anhand derer eine Identifikation weiterer Spezies möglich gewesen wäre.

Offensichtlich gelingt die Abtrennung der Analyten im Ultraspurenbereich von Matrixkomponenten und anderen störenden Hintergrundsignalen mit einem Quadrupol-Massenfilter besser.

Die mehrfache Fragmentierung, die eigentlich den großen Vorteil des Ion-Trap-



Systems darstellt, war bei den Testmessungen nur wenig erfolgreich. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Fragmente, die bei der ersten Ionisierung aus den metall(oid)organischen Verbindungen entstehen, bereits relativ stabil sind und so eine weitere Fragmentierung nur noch selten möglich ist. Nur in zwei Fällen konnten dadurch zusätzliche Informationen gewonnen werden (s. Abb. 8.4 S. 138 im Anhang). Zum einen ergab die erneute Fragmentierung der Masse 89 bei einer Retentionszeit von 14.26 Min, die von einem Monomethylarsenfragment stammen könnte, dass es sich bei der fraglichen Verbindung nicht um eine Arsenspezies handeln konnte, da in der  $MS^2$  – Aufnahme kein Arsenfragment ( $m/z$  75) mehr zu sehen war. Zum anderen ließ sich über die Anwesenheit der Masse 75 nach der erneuten Ionisierung des Fragments  $m/z = 137$  zeigen, dass es sich bei der Verbindung mit der Retentionszeit von 9.71 Min mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Arsenverbindung handelte. Da aber Informationen über die in einer unbekannten Verbindung enthaltenen Metall(oid)e in der geplanten Kopplung bereits durch die ICP-MS gegeben wären, stellen die Daten der erneuten Fragmentierung hinsichtlich dieser Fragestellung keine relevanten Zusatzinformationen dar.

Tabelle 3.2: Mit dem Ion-Trap-System PolarisQ (Thermo Finnigan) identifizierte Verbindungen.

RT [Min]	Vermutete Verb.	Beleg
<b>As</b>		
1,66	Monomethylarsin ( $MMAsH_2$ )	Kein $BS^a$ ) aber über Vergleich mit Abb. 8.1 S. 135
2,75	Dimethylarsin ( $DMAsh$ )	Kein $BS^a$ ) aber über Vergleich mit Abb. 8.1 S. 135
3,51	Trimethylarsen ( $TMAsh$ )	Kein $BS^a$ ) aber über Vergleich mit Abb. 8.1 S. 135
6,69	Monomethylarsen-x kein Diarsen	$MS^2$ von 150 zeigte keine $m/z$ 75 (s. Abb. 8.4 S. 138)
9,71	Dimethylmethylthioarsen ( $DMAshSM$ )	$m/z$ 75 nach $MS^2$ von 137 vorhanden (s. Abb. 8.4 S. )]
<b>Sn</b>		
3,63	Trimethylzinnhydrid ( $TMSnH$ )	Zuordnung der Fragmentionen [Daten nicht gezeigt]
<b>Sb</b>		
4,63	Trimethylantimon( $TMSb$ )	MS (Abb. 8.5 S. 138), BS bereits in Abb. 8.4 S. 138 gezeigt
<b>Te</b>		
5,56	Dimethyltellur ( $DMTe$ )	Zuordnung der Fragmentionen [Daten nicht gezeigt]

<sup>a)</sup> verwendete Bibliothek (NIST 2.0)

- *Begründung der Geräteauswahl*

Die Resultate der Probemessungen zusammenfassend, lässt sich folgendes festhalten: Einerseits liefert die einfache Fragmentierung und Selektion mit Hilfe des Quadrupol MS hinreichende Informationen zur Identifikation einer Vielzahl metall(oid) organischer Verbindungen in einer komplexen Matrix.

Andererseits ist die mehrfache Fragmentierung durch ein Ion-Trap-System entweder für die untersuchten Verbindungen aufgrund der Stabilität der Primärfragmente nicht praktikabel, oder wird durch die Kopplung an das ICP-MS redundant.

Demzufolge war für die speziellen Anforderungen ein Quadrupol-MS besser geeignet.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Daten wurden bereits veröffentlicht [Kösters et al. 2003].

### **3.2.2 Konstruktive Umsetzung und Aufbau der Kopplung**

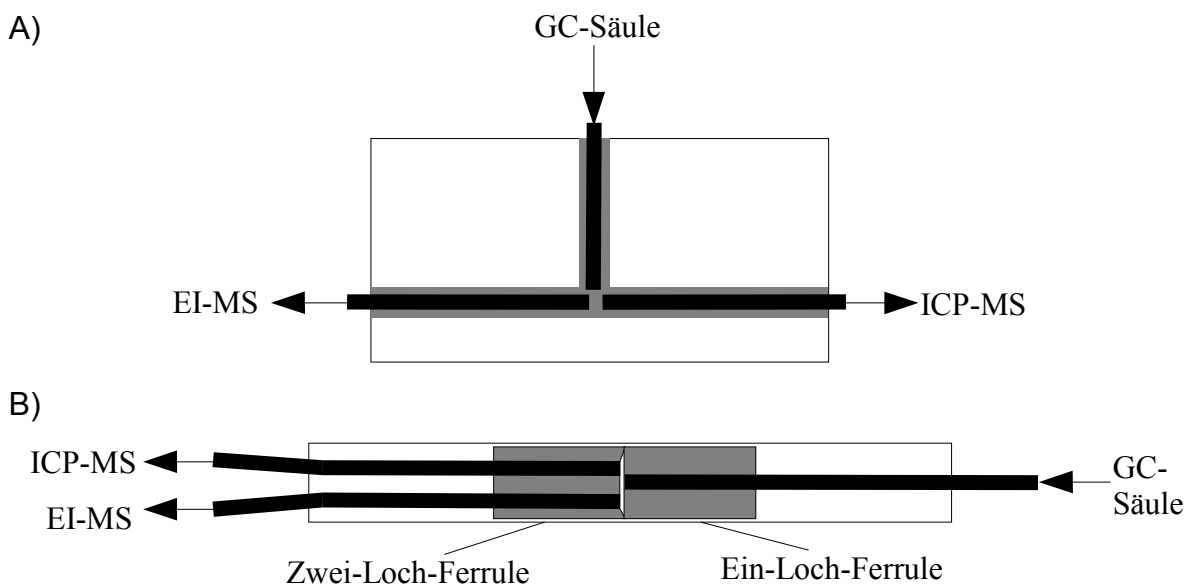
- ♦ *Aufteilung des Gasstroms durch einen Split*

Um eine parallele Detektion zu ermöglichen, ist es notwendig den Analytenstrom mit Hilfe eines Splits zu teilen. Dieser Split kann entweder als „pre column“ Split vor der chromatographischen Trennung positioniert sein, oder als „post column“ Split dahinter.

Der Vorteil des in dieser Arbeit verwendeten post column Splits ist die Gewährleistung gleicher chromatographischer Bedingungen und damit nahezu identischen Retentionszeiten für beide Detektionssysteme. Bei der Aufspaltung eines Gasflusses in einem chromatographischen System muss das durchspülte Totvolumen minimal sein, damit die Leistungsfähigkeit hinsichtlich Auflösungsvermögen und Peakform nicht durch Verwirbelungen beeinträchtigt wird. Der zunächst verwendete 3-Wege Split (JAS, Moers, s. Abb. 3.1 A) ) wies diesbezüglich erhebliche Defizite auf. Erst durch die Verwendung eines anderen Splittyps (SGE, Darmstadt, s Abb. 3.1 B) ) war eine Aufteilung des Analytenstroms auf zwei Transferleitungen ohne die zuvor beobachteten Beeinträchtigungen der chromatographischen Leistungsfähigkeit des Systems möglich.

Zur Minimierung des Totvolumens wird bei diesem Modell die chromatographische Säule in einem Ein-Loch-Ferrule direkt gegen ein spezielles Zwei-Loch-Ferrule

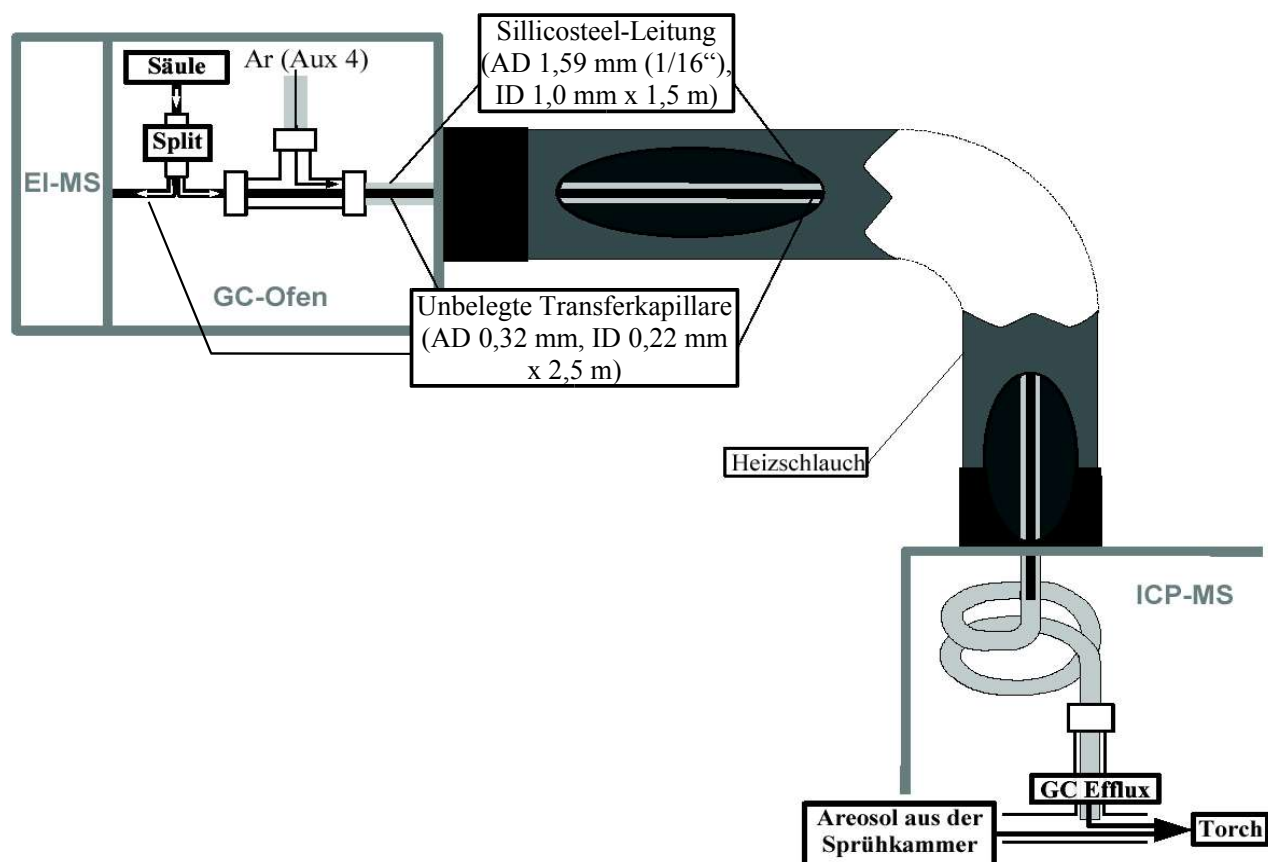
verschraubt, welches zwei unbelegte Kapillarsäulen (AD 0,32 mm, ID 0,22 mm, SGE, Darmstadt) als Transferleitungen gegen den Edelstahlkörper des Verbinders abdichtet. Das Splitverhältnis lässt sich über die Länge der Kapillarsäulen variieren.



**Abbildung 3.1:** Skizzen der getesteten Splits (nicht maßstabsgetreu). Die Verschraubungen wurden nicht dargestellt.

#### ♦ Transfer der Analyten zu EI-MS und ICP-MS

Während der Transfer zur Ionenquelle des EI-MS ohne weiteres durch das Einschrauben der unbelegten Transferkapillare (AD 0,32 mm, ID 0,22 mm x 2,5 m) in das standardmäßig für die GC-MS Kopplung vorgesehene Interface realisiert werden konnte, musste für den Transport der Analyten in das Plasma des ICP-MS eine spezielle Transferleitung konzipiert und konstruiert werden. Diese wird in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Transferleitung zum ICP-MS (nicht maßstabsgetreu modifiziert aus [Kösters et al. 2005])

Wie verschiedene Arbeiten zu diesem Thema zeigen konnten, ist die Verwendung eines Make-up Flusses zur Unterstützung des relativ geringen Trägergasflusses aus dem GC ein effektives Mittel um einer Peakverbreiterung durch Longitudinaldiffusion oder Kondensationseffekte entgegenzuwirken [Glindemann et al. 2002], [Bayon et al. 1999]. Um diese Option nutzen zu können, wurde im Inneren des GC Ofens ein T-Stück (Swagelok, BEST Ventil + Fitting GmbH, Karst-Holzbüttgen) installiert, über das mit Hilfe der Gasversorgung des GC (Aux 4) Argon zudosiert werden kann. Eine Leitung aus Silicosteel (AD 1,59 mm (1/16"), ID 1,0 mm x 1,5 m, Restek, Bellefonte, USA) führt von diesem T-Stück aus dem GC Ofen durch die obere Wand der Torchbox-Abdeckung und endet nach einigen Windungen im Inneren der Torchbox in einem weiteren T-förmigen Bauteil, welches zwischen der Sprühkammer und der ICP-Torch lokalisiert ist.

Das Silicosteel-Material gibt der Transferleitung zum einen mechanische Stabilität, zum anderen gewährleistet es durch die innenseitige Glasbeschichtung einen inerten

Transport der Analyten. Gleichzeitig wurde durch die Windungen ein ausreichendes Maß an Flexibilität erreicht, um den Deckel der Torchbox öffnen und schließen zu können. Das T-förmige Verbindungsstück zwischen Torch und Sprühkammer ist wie diese Bauteile ebenfalls aus Glas und über Kugelschliffe mit diesen verbunden. Um eine Verbindung mit der Sillicosteel-Leitung zu ermöglichen wurde auf den freien Schenkel ein Metallrohr (AD 6,35 mm (1/4“) x 2,5 cm) aufgeschmolzen. Hierzu musste ein Metall verwendet werden, dessen Legierung den gleichen Ausdehnungskoeffizienten wie Glas besitzt, damit der Glaskörper nach dem Abkühlungsprozess keinen Spannungen ausgesetzt ist. Ein Übergangsstück aus Edelstahl (6,35 mm (1/4“) auf 1,59 mm (1/16“)) ermöglichte die Verbindung dieses Metallrohrs und der Sillicosteel-Leitung, die jeweils gegen Vespel<sup>™</sup> Ferrules mit entsprechender Bohrung gasdicht verschraubt wurden. Das Ende der Leitung wurde dabei unmittelbar über dem Aerosolstrom (Argon/Wasser) aus der Sprühkammer positioniert um einen unverzüglichen Weitertransport der Analyten aus dem GC Efflux in das Plasma zu erreichen.

Darüber hinaus konnte der durch den Transfer verursachte chromatographische Auflösungsverlust dadurch minimiert werden, dass der Abstand zwischen dem Ende der unbelegten Transferkapillare (AD 0,32 mm, ID 0,22 mm x 2,5 m) und dem Plasma so gering wie möglich gewählt wurde. Zu diesem Zweck wurde die Kapillare durch das T-Stück im GC Ofen und durch die Sillicosteel-Leitung bis zur ersten Windung im Inneren der Torchbox geschoben. Zur Abdichtung am T-Stück wurde erneut ein Vespel Ferrule verwendet. Da die Beweglichkeit der Torchbox Abdeckung erhalten bleiben sollte und die Flexibilität der Transferleitung durch eine Fortführung der fragilen Kapillare im Inneren der gewundenen Stahlleitung beeinträchtigt worden wäre, war eine weitere Verringerung des Abstandes nicht möglich. Aufgrund der erhöhten Flussgeschwindigkeit durch den Make-up Strom und der Kürze der Strecke konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass der Einfluss des größeren Innendurchmessers auf die Retardierung beziehungsweise Verbreiterung des Analytsignals vernachlässigbar ist.

Über einen elektrischen Heizschlauch (Tyco, Heidelberg) lässt sich die Transferleitung zwischen GC Ofen und ICP-MS auf bis zu 200°C heizen. Im Inneren der Torchbox ließ sich eine Beheizung der Transferleitung aus Sicherheitsgründen nicht realisieren. Trotz der fehlenden Heizung auf diesem letzten Stück ist der Temperaturverlust und die damit verbundene Gefahr einer Kondensation der

Analyten als gering anzusehen, da die Wärmeleitung der Stahlkapillare relativ hoch ist und der Analyttransport durch den erwähnten Make-up Strom beschleunigt wird.

♦ *Optionale Zudosierung flüssiger Standards*

Im Gegensatz zu einem kommerziellen GC/ICP-MS Interface (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und verschiedenen in der Literatur beschriebenen Lösungen [Glindemann et al. 2002], [Bayon et al. 1999] ist es bei der in dieser Arbeit vorgestellten Kopplung möglich, neben trockenen auch feuchte Plasmabedingungen zu verwenden, da der GC Efflux über das erwähnte T-Stück direkt hinter dem Ausgang der Sprühkammer zugeführt wird. Während unter trockenen Plasmabedingungen weniger Oxide und Hydroxide gebildet und damit isobare Interferenzen reduziert werden, erlaubt die Option der Zudosierung eines flüssigen internen Standards über Zerstäuber und Sprühkammer eine simple und kostengünstige Überwachung der Plasmastabilität und Kompensierung von Variabilitäten in der Empfindlichkeit der ICP-MS.

Durch die Verwendung einer Multielementlösung, die sowohl den internen Standard in gleicher Konzentration als auch das zu untersuchende Element in bekannter Konzentration enthält, kann ein relativer Empfindlichkeitsfaktor ermittelt werden. In Kombination mit dem Massenfluss des internen Standards ist man so in der Lage, das ICP-MS elementspezifisch zu kalibrieren. Weitere Details zu dieser Kalibriermethode wurden bereits an anderer Stelle beschrieben [Feldmann 1997], [Diaz-Bone 2006].

Die Option der elementspezifischen Kalibrierung mittels flüssiger Elementstandards eröffnet eine Möglichkeit, quantitative Aussagen auch dann zu treffen, wenn speziesspezifische Kalibration aufgrund der Vielzahl der zu untersuchenden Verbindungen oder der eingeschränkten Verfügbarkeit entsprechender Standards nicht durchführbar ist. Letzteres trifft für metall(oid)organische Verbindungen im Allgemeinen aber im Besonderen für deren flüchtige Vertreter zu.

♦ *Anpassung der Flussparameter*

Da der oben beschriebene Aufbau eine direkte Verbindung zwischen verschiedenen Druckniveaus herstellt, mussten Maßnahmen getroffen werden, die verhindern, dass Argon aus dem ICP-MS, welches unter Umgebungsdruck betrieben wird, in das

Vakuum der Ionenquelle des EI-MS strömt. Neben dem geringen Innendurchmesser und der Länge der Transferkapillaren zeigte sich, dass die Erhöhung des Trägergasflusses einen wichtigen Parameter darstellte. Die zunächst eingestellten Flussgeschwindigkeiten zwischen 1 und 2 mL/Min erzeugten nicht genug Gegendruck, um einen Durchbruch des Argons zu unterbinden. Erst ein ungewöhnlich hoher Heliumfluss von 5 mL/Min war diesbezüglich ausreichend. Auch der zusätzliche Fluss des Argon Make-up Stroms hatte hierauf eine zusätzliche positive Wirkung. Die Flussgeschwindigkeit musste jedoch optimiert werden, da die höheren Flüsse die Stabilität des Plasmas beeinflussten und zu einer Reduzierung des Gesamtsignals führten.

Um die Leistungsfähigkeit der Transferleitung hinsichtlich des Transportes schwer flüchtiger Verbindungen zu überprüfen und den Argon Make-up Fluss zu optimieren, wurden Tetraethyl- und Tetrabutylzinn injiziert. Die Auswertung der ICP-MS Chromatogramme der Masse 120 sowie der Einfluss des Make up Flusses auf das Rhodiumsignal als internem Standard ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

*Tabelle 3.3: Relative Peakhöhen sowie halbe Peakbreiten von Tetraethyl- (TeESn) und Tetrabutylzinn (TeBSn) zur Optimierung des Make up Flusses in der Transferleitung (über Aux4) zum ICP-MS*

Ar Druck (Aux 4) [kPa]	Peakhöhe [counts]		RT <sub>TeBSn</sub> [Sek]	Halbe Peakbreite [Sek]	Rel. Peakhöhe TeBSn/TeESn [%]	10 ppb Rh [counts]
	TeESn	TeBSn				
25	2,02E+06	1,05E+04	1104	484	0,52	27000
50	1,85E+06	1,53E+04	886	277	0,82	27000
100	1,03E+06	1,39E+04	779	136	1,35	19000
150	4,55E+05	1,03E+04	730	77	2,27	14000

Aufgrund der Signalreduzierung durch den zusätzlichen Argonfluss, die anhand der abnehmenden Intensität des Rhodiumsignals und sinkenden Peakhöhen des TeESn zu erkennen ist, wurde die Veränderung der Peakhöhe des TeBSn als relative Peakhöhe auf die Höhe des TeESn-Peaks bezogen.

Wie die Auflistung zeigt, konnte eine Erhöhung des Argonflusses in der Transferleitung neben der Verringerung der Retentionszeit erfolgreich zu einer Anhebung der relativen Peakhöhen sowie einer Senkung der halben Peakbreiten

und damit zur Verbesserung des Transfers beitragen. Für entsprechende Anwendungen mit Analyten in diesem Siedepunktbereich ( $> 250^{\circ}\text{C}$ ) ist dann eine Anpassung der Plasma-Gasflüsse der ICP-MS notwendig. Weitergehende Optimierungen für Verbindungen mit derart geringer Flüchtigkeit sollten aber zunächst bei der Verbesserung der Heizung und der Isolation des letzten Stückes der Transferleitung im Inneren der ICP-MS ansetzen, da dieses vermutlich eine stärkere Limitierung des Transports von Analyten in diesem Siedepunktbereich darstellt.

Für die üblicherweise untersuchten leicht flüchtigen bis gasförmigen Verbindungen ist nach diesen Untersuchungen aufgrund der festgestellten Störung der Plasmaeigenschaften bei höheren Make up Flüssen ein Argon Druck unter 50 kPa empfehlenswert.

Bei diesen Anpassungen der Gasflüsse sowie der Dimensionierung der Transferleitungen war stets darauf zu achten, dass der zeitliche Abstand, mit dem die Signale die Detektoren des EI-MS bzw. ICP-MS erreichen, minimal blieb. Die Überprüfung dieser Zielvorgabe und die Bewertung der chromatographischen Eigenschaften des Gesamtaufbaus werden in Kapitel 3.2.3 ausgeführt.

### **3.2.3 Bewertung analytischer und chromatographischer Parameter**

Um die Funktionsfähigkeit des methodischen Konzeptes unter Beweis zu stellen und dessen Leistungsvermögen beurteilen zu können, wurden die homologen Iodalkane Iodmethan, Iodethan, 2-Iodpropan und 1-Iodpropan verwendet. Im Gegensatz zu den meisten metall(oid)organischen Verbindungen sind diese Iodalkane als Standards zu erwerben und mit einem Siedepunktspektrum zwischen  $42^{\circ}\text{C}$  und  $102^{\circ}\text{C}$  als Flüssigkeiten gut handhabbar. Darüber hinaus ist das Heteroatom Iod im Plasma leicht zu ionisieren und mit der monoisotopen Masse 127 ohne größere Interferenzen bei sehr geringem Hintergrund zu messen. Als Lösungsmittel wurde Dekan ausgewählt, dessen Siedepunkt von  $174^{\circ}\text{C}$  eine Retentionszeit weit nach den untersuchten Analyten bedingt, und damit deren chromatographische Trennung nicht beeinflusst.

#### **♦ Analytische Daten**

Um Empfindlichkeit, Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Präzision der beiden Detektionssysteme zu ermitteln und diese Daten vergleichen zu können,



wurde eine Kalibrationsreihe mit den Iodalkanen mittels Flüssiginjektion vermessen.

- *Experimentelles*

Die Iodalkane Iodmethan, Iodethan, 2-Iodpropan und 2-Iodpropan wurden über ihre Volumina in Dekan verdünnt und die absoluten Mengen unter Berücksichtigung der entsprechenden Dichten berechnet. Für die ICP-MS Daten wurde eine Korrektur auf die in der jeweiligen Komponente vorkommende Menge Iod vorgenommen. Die resultierenden Konzentrationen der Standards für jede Verdünnungsstufe als Verbindung (für die EI-MS Daten) oder bezogen auf das Iod (für die ICP-MS Daten) sind in Tabelle 3.5 (S. 55) aufgelistet.

Von jeder Verdünnungsstufe wurde 1  $\mu\text{L}$  je dreimal via Autosampler injiziert. Als Blindwert wurde nur Dekan eingespritzt. Ein minimaler Injektorsplit von 4:1 sollte hierbei ein Maximum an Empfindlichkeit garantieren. Alle weiteren Parameter stimmen mit den in Tabelle 3.10 (S. 71) für die Flüssiginjektion aufgeführten Werten überein. Die Nachweisgrenzen (NWG) wurden unter Verwendung der dreifachen Standardabweichung des Hintergrunds ( $\sigma$ ) im Verhältnis zu den Peakhöhen der Verbindungen bei jeweils der niedrigsten erfassten Verdünnungsstufe berechnet. Für die Bestimmungsgrenzen (BG) wurden entsprechend  $10\sigma$  angesetzt. Als Maß für die Empfindlichkeit der Detektoren wurde die Steigung der Regressionsgerade betrachtet. Integriert wurden die Chromatogramme des ICP-Signals auf der Masse 127. Zur quantitativen Auswertung der EI-MS Daten wurden die Massenspuren der jeweiligen Moleküle herangezogen ( $m/z$  142: Iodmethan,  $m/z$  156: Iodethan,  $m/z$  170: 2-Iodpropan und 1-Iodpropan).

Die wichtigsten Betriebsparameter der Detektionssysteme und der Transferleitungen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Betriebsparameter für EI-MS, ICP-MS und Transferleitungen

<b>EI-MS</b>	Massenfenster	m/z 39 – 550
	(„scan“ Modus zur Strukturanalytik)	
	Quadrupol	150°C
	EI Quelle	230°C
	Transferleitung	275°C
<b>ICP-MS</b>	Argonfluss	15 L/Min
	Trärgasfluss (Ar)	0,53 L/Min
	Makeup Gas (Ar)	0,56 L/Min
	RF Power	1580 W
	Transferleitung	
	Temperatur	200°C,
	Make up Fluss (Ar)	85 mL/Min (20 kPa über Aux 4)

#### • Ergebnisse der Kalibration

Die ICP-MS wurde über vier Größenordnungen in sechs Verdünnungsstufen mit Konzentrationen zwischen  $1 \times 10^{-2}$  ng/μL und  $5 \times 10^1$  ng/μL (bezogen auf Iod) kalibriert. Die dabei gemessenen relativen Standardabweichungen reichten von 0.31 % bis 6.0 %. Mit dem EI-MS konnten aufgrund der Verwendung des weniger empfindlichen „scan“ Modus, nur die vier höher konzentrierten Verdünnungsstufen über zwei Größenordnungen zwischen  $1 \times 10^0$  ng/μL und  $5 \times 10^1$  ng/μL (bezogen auf die Verbindung) detektiert werden. Die hierbei ermittelten relativen Standardabweichungen waren mit Werten zwischen 0.88 % und 7.5 % in einem sehr ähnlichen Bereich wie die ICP-MS Ergebnisse angesiedelt. Die exakten Konzentrationen sind in Tabelle 3.5 den jeweilig gemessenen relativen Standardabweichung zugeordnet. Die Kalibrationsgraphen resultieren aus linearen Regressionen der Mittelwerte und sind in Abbildung 3.3 dargestellt

Tabelle 3.5: Zur Kalibration von EI-MS und ICP-MS injizierte Mengen an Iodalkanen und entsprechende relative Standardabweichungen (RSD) der Messungen

		EI-MS <sup>a</sup>				ICP-MS <sup>b</sup>					
Iodmethan	Konz. [ng/μL]	2,28	4,56	22,8	45,6	0,0204	0,204	2,04	4,08	20,4	40,8
	RSD <sub>Fläche</sub> [%]	1,7	3,0	4,8	2,4	3,33	1,42	0,43	2,91	5,99	1,64
Iodethan	Konz. [ng/μL]	1,97	3,94	19,7	39,4	0,0016	0,16	1,6	3,02	16	30,2
	RSD <sub>Fläche</sub> [%]	0,88	2,01	5,33	1,63	4,52	1,41	0,85	2,55	4,98	1,3
2-Iodpropan	Konz. [ng/μL]	1,7	3,4	17	34	0,0127	0,127	1,27	2,54	12,7	25,4
	RSD <sub>Fläche</sub> [%]	5,32	4,09	6,01	2,18	3,96	1,2	0,69	2,45	5,52	1,61
1-Iodpropan	Konz. [ng/mL]	1,74	3,48	17,4	34,8	0,0129	0,129	1,29	2,58	12,9	25,8
	RSD <sub>Fläche</sub> [%]	7,49	2,91	4,22	1,66	2,71	0,59	0,31	2,7	5,08	1,22

<sup>a</sup> bezogen auf die Verbindung, <sup>b</sup> bezogen auf Iod

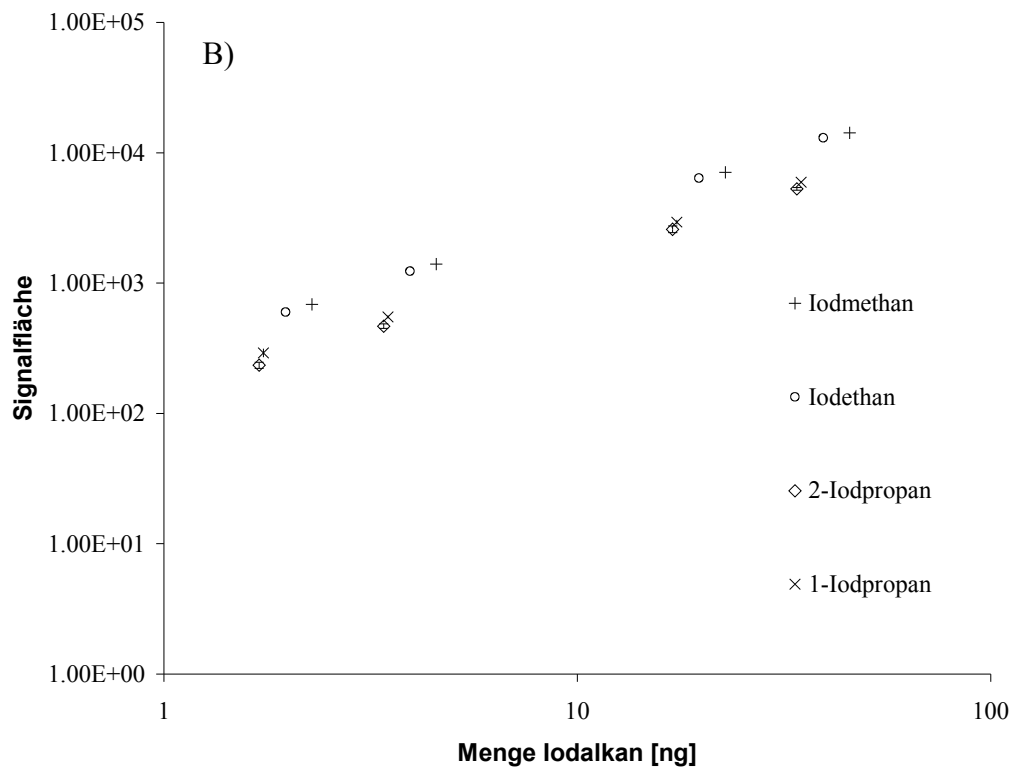
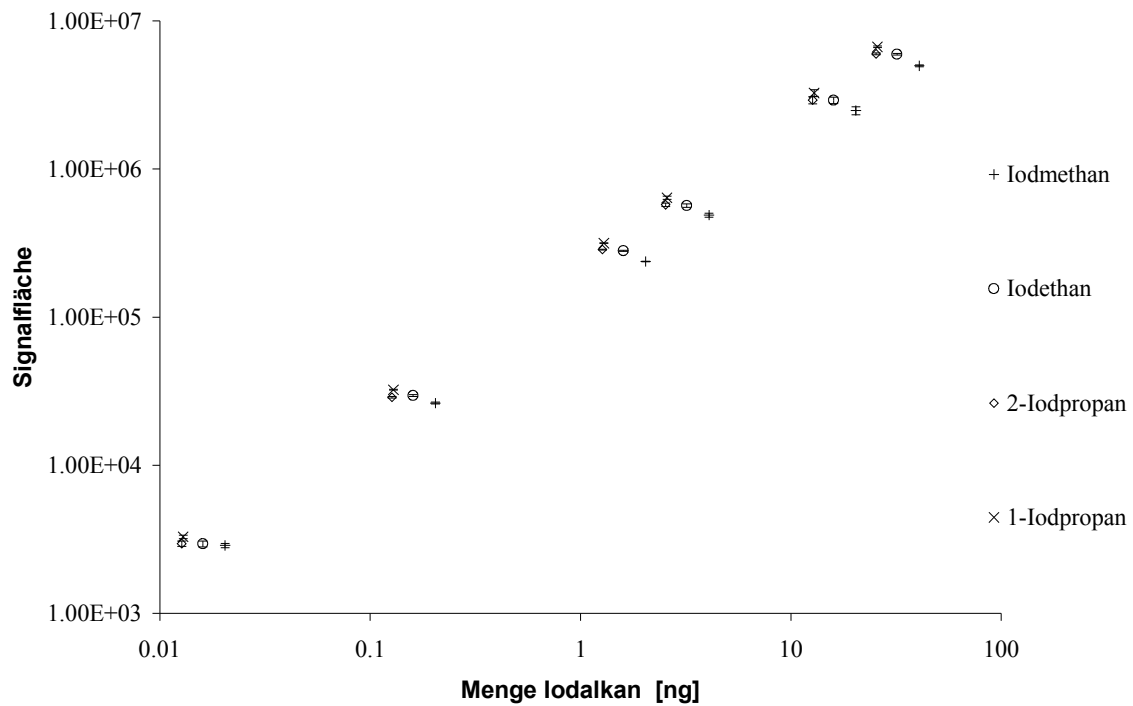


Abbildung 3.3: Lineare Kalibrationen der Iodalkane in doppellogharithmischer Auftragung.

A) ICP-MS B) EI-MS (modifiziert aus [Köstern et al. 2005])

Wie die Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) in Tabelle 3.6 belegen, konnte für alle untersuchten Verbindungen sowohl für die EI-MS als auch die ICP-MS Detektion eine exzellente Linearität über den entsprechenden Kalibrationsbereich ermittelt werden. Nachweisgrenzen (NWG), Bestimmungsgrenzen (BG) und Empfindlichkeit sind in derselben Tabelle aufgeführt. Soweit nicht anderweitig gekennzeichnet wurden die Daten bereits in einer eigenen Arbeit veröffentlicht [Kösters et al. 2005].

Tabelle 3.6: Analytische Daten ermittelt aus der Kalibration von EI-MS („scan“ Modus) und ICP-MS

	EI-MS				ICP-MS				
	NWG [pg]	BG [pg]	$R^2$	NWG Lit. <sup>a</sup> [pg] (SIM)	NWG [pg]	BG [pg]	Empfindlichkeit [Fläche*ng <sup>-1</sup> ]	$R^2$	NWG Lit. <sup>a</sup> [pg]
Iodmethan (m/z 142)	18	60	>0,99	3 - 10	0,6	2,1	121862	>0,99	0,5
Iodethan (m/z 156)	20	67	>0,99		0,6	2,1	185811	>0,99	
2-Iodpropan (m/z 170)	50	180	>0,99		0,6	1,9	235418	>0,99	
1-Iodpropan (m/z 170)	50	165	>0,99		0,6	2,1	258337	>0,99	

<sup>a</sup> [Schwarz und Heumann 2002]

#### • Diskussion der analytischen Eckdaten

Die Beurteilung der Daten bezüglich der Präzision der Methode lässt sich am besten in Kombination mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der Probenaufgabesysteme in Kapitel 3.3.3 durchführen und werden daher dort im Zusammenhang diskutiert (S. 73).

Die in Tabelle 3.6 gezeigten Daten bestätigen die Vorteile der ICP-MS Detektion hinsichtlich der Quantifizierung, die einleitend in Kapitel 2.2.2 (S. 19) diskutiert wurden. Trotz des methodenbedingten Verlustes im Injektor und der Aufteilung des Analytenstroms durch den „post column“ Split war die erzielte absolute Nachweisgrenze von 0.6 pg bezogen auf Iod für alle untersuchten Iodalkane vergleichbar mit Werten wie sie in der Literatur für eine ähnliche Studie ermittelt wurden [Schwarz und Heumann 2002]. Obwohl die Messungen in dieser Studie im weniger empfindlichen „scan“ Modus durchgeführt wurden, um molekülspezifische Informationen durch komplette Massenspektren zu erhalten, konnten für die Detektion mittels EI-MS Nachweisgrenzen zwischen 18 und 50 pg

erzielt werden. Auch diese Daten sind durchaus zufriedenstellend und halten dem Vergleich mit aktuellen Studien ohne parallele Detektion stand. In der oben zitierten Untersuchung geben die Autoren für die Detektion verschiedener Iodverbindungen mittels EI-MS Nachweisgrenzen zwischen 3 pg und 10 pg an. Diese Literaturdaten liegen zwar unter den mit der parallelen Detektion ermittelten Werten, sind aber dennoch als vergleichbar anzusehen, wenn man berücksichtigt, dass sie im empfindlicheren SIM Modus bestimmt worden sind.

Betrachtet man die in Tabelle 3.6 dargestellten, mit dem ICP-MS ermittelten Empfindlichkeiten, so fällt dabei mit abnehmendem Siedepunkt der Verbindungen eine tendenzielle Abnahme der pro ng gemessenen Fläche auf.

Schon aus theoretischen Erwägungen sollte aber der Grad der Ionisierung eines Elements im Plasma, welcher die elementspezifische Sensitivität dieses Detektors maßgeblich beeinflusst, unspezifisch hinsichtlich der genauen Beschaffenheit der zu analysierenden Elementspezies sein. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn sich die Verbindungen nur durch die Länge der jeweilig gebundenen Kohlenwasserstoffketten unterscheiden, wie es bei den untersuchten Iodalkanen der Fall ist.

Zudem konnten Schwarz und Heumann in der bereits erwähnten Arbeit konkret zeigen, dass die Empfindlichkeit des ICP-MS Detektors hinsichtlich des Iodsignals von der Natur der Alkylrestes nahezu unabhängig ist. Die beobachtete speziesabhängige Selektivität in der Empfindlichkeit der beschriebenen Methode deutet daher auf einen Verlust der leichter flüchtigen Verbindungen zu einem früheren Zeitpunkt des analytischen Prozesses hin.

Im EI-MS ist die Empfindlichkeit abhängig vom Fragmentierungsgrad eines Moleküls sowie der Häufigkeit des zur Quantifizierung verwendeten Fragments. Damit ist sie extrem molekülspezifisch und der Vergleich der Verbindungen untereinander wenig aussagekräftig. Abweichungen in der Empfindlichkeit treten selbst bei homologen Verbindungen auf und können nicht ohne weiteres als Kriterium für Unregelmäßigkeiten während des analytischen Prozesses herangezogen werden. Auf die Darstellung dieser Daten und deren Berücksichtigung in der Diskussion wurde daher verzichtet.

Als Ursache für die speziesspezifische Verringerung der massenbezogenen Signalantwort des ICP-MS Detektors ließ sich ein Verlust durch Kondensation weitestgehend ausschließen. Hiervon wären in erster Linie die höher siedenden

Verbindungen betroffen, was eine umgekehrte Tendenz bei der Empfindlichkeitsabnahmen zur Folge gehabt hätte.

Eine Überprüfung der Standards zeigte, dass trotz Kühlung von Lösungsmittel und Standards bei der Verdünnung Verdampfungsverluste aufgetreten sind, die den beobachteten Effekt erklären (s. Kapitel 3.3.3 S. 69).

Daher liegen die Steigungen der Kalibrationsgraphen der geringer flüchtigen Iodalkane, und damit die für diese Verbindungen im ICP-MS zu erwartenden Empfindlichkeiten, ebenfalls im Bereich des 1-Iodpropan. Die Nachweisgrenzen für diese Spezies sind dementsprechend noch etwas besser als in Tabelle 3.6 dargestellt. Diese Werte wurden jedoch bewusst nicht korrigiert, da zum einen die hierdurch notwendige Fehlerdiskussion sehr gut geeignet war, den Vorteil eines elementspezifischen aber speziesunspezifischen Detektors für die Kontrolle des analytischen Prozesses zu demonstrieren. Zum anderen hätte sich auch eine Korrektur dieser Daten nicht auf die wesentlichen Aussagen dieses Experimentes ausgewirkt. Denn selbst ohne Berücksichtigung des Verdampfungsverlustes bei den leicht flüchtigen Iodalkanen belegen die gezeigten Daten, dass trotz der Teilung des Analytstroms, zwecks simultaner Aufnahme des Fragmentmassenspektrums, die Vorzüge des ICP-MS Detektors für die quantitative Elementspeziation, hinsichtlich Nachweisstärke und Linearität, erhalten bleiben.

#### ♦ *Chromatographische Daten*

Abbildung 3.4 zeigt ein Chromatogramm des ICP-MS Signals der Masse 127 nach Flüssiginjektion des gleichen Iodalkanstandards via Autosampler. Die entsprechend injizierten Mengen bezogen auf Iod sind in Tabelle 3.11 (S. 73) aufgeführt. Für 2-Iodpropan und 1-Iodpropan ist zum Vergleich in Abbildung 3.5 das EI-MS Chromatogramm der Ionenspur  $m/z$  170 dargestellt.

Die symmetrische Peakform mit Halbwertsbreiten zwischen 0,65 und 0,86 Sekunden bestätigen für Verbindungen im untersuchten Siedepunktbereich einen zufriedenstellenden Transport der Analyten durch die Transferleitung. Diese kann dabei nicht für das minimale Tailing, das für die schwerer flüchtigen Verbindungen zu erkennen ist, verantwortlich sein, da es mit beiden Detektoren beobachtet wurde.

Tabelle 3.7: Retentionszeiten, Halbwertsbreiten und daraus berechnete Auflösung für 2-Iodpropan und 1-Iodpropan im Vergleich von ICP-MS und EI-MS Detektion.

	ICP-MS			EI-MS		
	RT [Sek]	Halbe Peakbreite [Sek]	Auflösung	RT [Sek]	Halbe Peakbreite [Sek]	Auflösung
<b>2-Iodpropan</b>	84,25	0,65	14,98	83,22	1,08	9,16
<b>1-Iodpropan</b>	93,54	0,65		92,34	0,72	

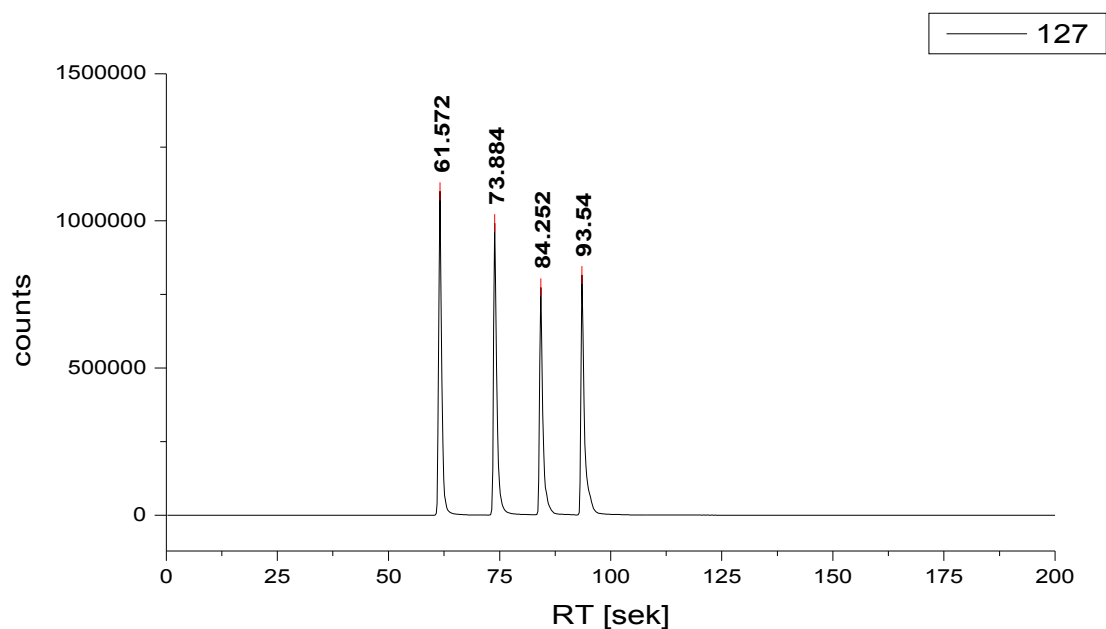
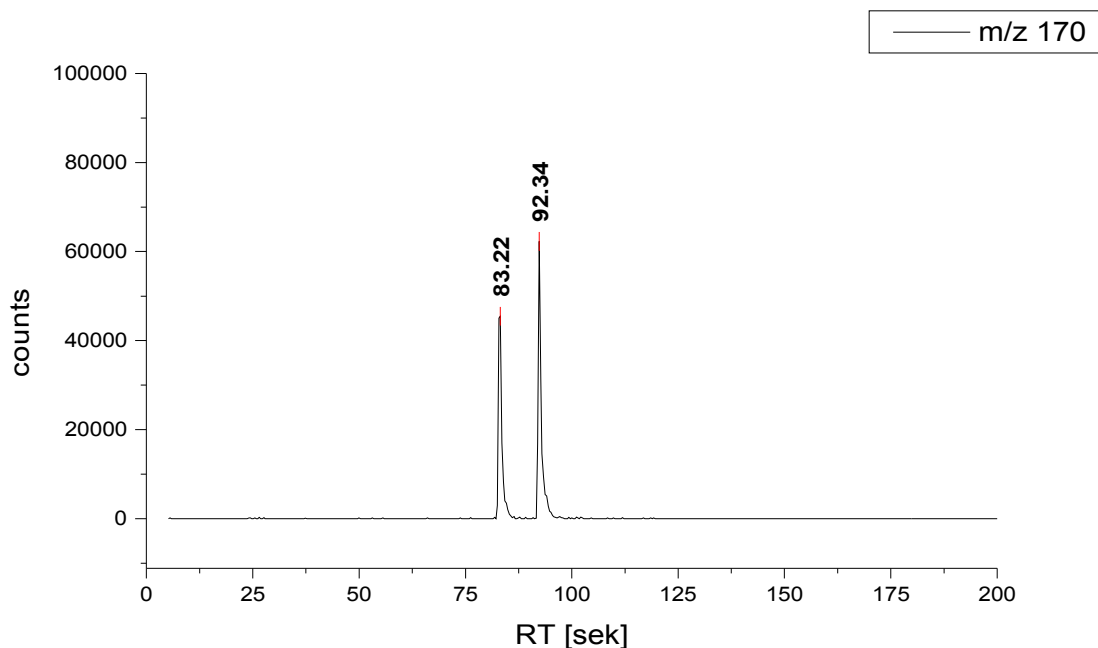


Abbildung 3.4: ICP-MS Chromatogramm der untersuchten Iodalkane anhand der Massenspur m/z 127. 61,6 Sek : Iodmethan, 73,9 Sek Iodethan, 84,3 Sek: 2-Iodpropan, 93,5 Sek: 1-Iodpropan. Injizierte Mengen s. Tab. 3.11





**Abbildung 3.5: EI-MS Chromatogramm von 2-Iodpropan (83,22 Sek) und 1-Iodpropan (92,34 Sek) über den Molekülpeak m/z 170.**

Tabelle 3.7 zeigt diese Werte für die Peaks des 1-Iodpropan und des 2-Iodpropan sowie die sich daraus ergebende chromatographische Auflösung nach Gleichung 2.6 im Vergleich der beiden Detektoren. Sowohl EI-MS als auch der ICP-Detektion zeigten diesbezüglich vergleichbar gute Werte, wodurch nochmals belegt wird, dass die Transferleitung zum ICP-MS keinerlei Limitierung der chromatographischen Leistung des Gesamtsystems verursacht, welche, trotz der für die parallele Kopplung notwendigen Umbauten, als sehr gut bewertet werden kann. Dass der Wert für die ICP-MS Detektion sogar geringfügig höher liegt, ist auf die niedrigen Halbwertsbreiten zurückzuführen. Hierfür könnte der Make-up-Fluss der Transferleitung verantwortlich sein, der die Peaks möglicherweise minimal zusammenschiebt.

Tabelle 3.8 zeigt die Retentionszeiten, die für die jeweilige Verbindung mit dem EI-MS bzw. mit dem ICP-MS ermittelt worden sind. Trotz der unterschiedlichen Druckverhältnisse an den Enden der jeweiligen Transferleitungen, konnte durch die Anpassung der Flussparameter und der Dimensionierung der Transferleitungen eine Synchronisierung der Detektorsignale mit einer minimalen Verzögerung des ICP-MS

Signals von nur einer Sekunde erreicht werden. Ein direkter Vergleich von ICP-MS und EI-MS Chromatogrammen wurde damit deutlich vereinfacht. Mit Hilfe der elementspezifischen Signale des ICP-MS lassen sich die entsprechenden Peaks der Elementspezies im EI-MS-Chromatogramm problemlos zuordnen. Sofern die Menge dieser Verbindung für eine Detektion durch das EI-MS im „scan“ Modus ausreichend war, ist dann simultan ein Massenspektrum verfügbar, welches wertvolle Informationen zur Verifizierung bzw. Identifizierung der zum Zeitpunkt der Messung vorliegenden Spezies liefert. Die Massenspektren der untersuchten Iodalkane sind im Anhang abgebildet (s. Abb. 8.7 S. 140).

*Tabelle 3.8: Vergleich der für EI-MS und ICP-MS detektierten Retentionszeiten*

	EI-MS		ICP-MS		Abweichung [Sek]
	RT [Sek]	SD [Sek]	RT [Sek]	SD [Sek]	
<b>Iodmethan</b>	60,26	0,2	61,53	0,0965	1,26
<b>Iodethan</b>	72,79	0,16	73,88	0,0011	1,09
<b>2-Iodpropan</b>	83,24	0,04	84,25	0,0011	1,01
<b>1-Iodpropan</b>	92,39	0,18	93,54	0,0012	1,15

### **3.3 Entwicklung eines variablen Probenaufgabesystems**

#### **3.3.1 Konzeptionelle Überlegungen**

Um die zu entwickelnde Kopplungsmethode auf ein möglichst breites Probenspektrum anwenden zu können, bestand der Anspruch, möglichst viele Probenaufgabeoptionen in das methodische Konzept zu integrieren.

Weiterhin sollte ein hoher Grad an Automatisierung durch die Minimierung manueller Arbeitsschritte bei der Probenaufgabe erreicht werden. Denn nur so ist es möglich, ausreichende Probenzahlen in einer vertretbaren Zeit messen zu können, um den Anforderungen einer verlässlichen Analytik hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Präzision gerecht zu werden.

Zu diesem Zweck wurde das GC mit dem PAL Autosampler der Firma CTC Analytics (Zwingen, Schweiz) ausgerüstet. Dieser ist in x-, y- und z-Richtung frei programmierbar und mit Hilfe variabler Injektionsmodule in der Lage, Probenaufgaben *via* Flüssiginjektion, mittels Headspace-Technik oder durch SPME (Solid Phase Micro Extraction) automatisiert durchzuführen.

Dabei kann die Injektion wahlweise im vorderen oder im hinteren Injektor erfolgen. Letzterer ist ein UNIS 2100 PTV (Programmed Temperature Vaporisation) Injektor von JAS (Moers, Deutschland) und als solcher mit einer Stickstoffkühlung sowie einer ballistischen Heizung versehen, die eine temperaturprogrammierte Verdampfung der Analyten ermöglicht. Somit war es möglich, diesen Injektor direkt in ein Kaltaufgabesystem zu integrieren, da er zur Refokussierung der Analyten und zur Probenaufgabe in Form einer Thermodesorption eingesetzt werden konnte.

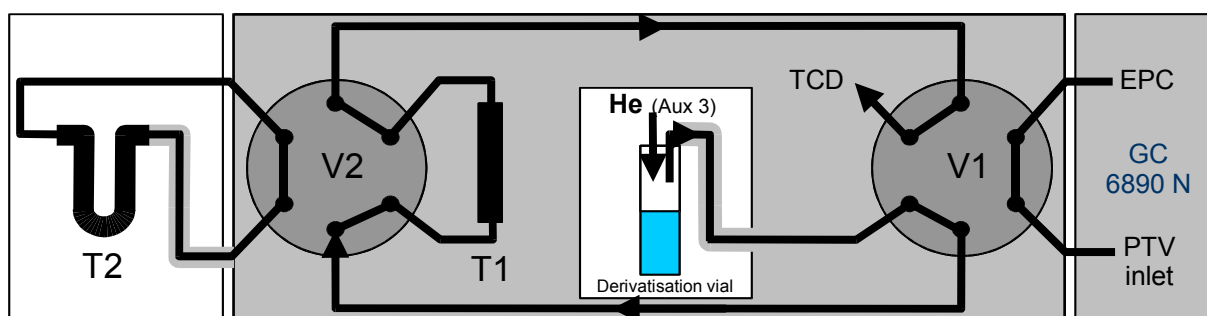
Die Notwendigkeit ein solches System zu konzipieren, entstand aus der Anforderung neben der Probenaufgabe mit den oben erwähnten Routinemethoden sowohl on-line volatile Analyten mit Purge & Trap Techniken, als auch off-line auf Kühlfallen gesammelte Gasproben, auf das chromatographische System bringen zu können. Um auch hier einen hohen Automatisierungsgrad erreichen zu können, war es für die Auswahl der zur Konstruktion benötigten Komponenten maßgeblich, dass alle Prozesse, wie das Schalten der Ventile sowie die Regelung der Gasflüsse und der Temperaturen, über die GC-Software gesteuert und in den chromatographischen Programmablauf eingebettet werden konnten.

Auch diesbezüglich konnte die Firma Agilent Technologies mit ihrem Chanel-Partner

JAS ein zufriedenstellendes Konzept anbieten. Allerdings waren für die speziellen Anforderungen individuelle Anpassungen sowie diverse Umbauten und Ergänzungen notwendig, die nachfolgend im Ergebnis vorgestellt werden.

### 3.3.2 Aufbau und Funktionsprinzip des automatisierten Kaltaufgabesystems

Eine schematische Zeichnung des automatisierten Kaltaufgabesystems ist in Abbildung 3.6 wiedergegeben. Die grau hinterlegten Bereiche sind dabei heizbare Zonen. Über das Ventil V2 lassen sich alternativ zwei verschiedene Kühlfallen (T1 oder T2) zur Einkondensierung der Analyten in den Flussweg schalten. Im Folgenden werden diese beiden Aufgavevarianten näher erläutert.



**Abbildung 3.6:** Schematische Skizze des automatisierten Kaltaufgabesystems. T1: Kühlfalle 1, T2: Kühlfalle 2, V1: Ventil 1, V2: Ventil 2, TCD: Wärmeleitfähigkeitsdetektor, EPC: elektron. Druckkontrolle, PTV: Temperaturgesteuerte Verdampfung.

#### ♦ *Purge & Trap Aufgabe (über T1)*

In einem ersten Schritt werden die flüchtigen Analyten aus einem mittels Septum verschlossenem 20 mL Headspace-Gefäß auf eine erste mit flüssigem Stickstoff gekühlte Trap (**T1**) gepurged. Diese Kühlfalle besteht aus einem Edelstahlrohr ( $\varnothing$  3,18 mm (1/8") x 10 cm) und wurde mit Polydimethylsiloxan (PDMS) beschichtetem Packungsmaterial (Supelco port 2100 auf mesh 80/100) gefüllt, welches mit Glaswolle fixiert wurde. Um die Berechnung der Gasflüsse durch die EPC des GC nicht zu beeinflussen, musste die Trap einen geringen Strömungswiderstand aufweisen. Daher wurde eine sehr lockere Packung mit sehr wenig Packungsmaterial eingesetzt.

Eine Kapillarkühlfalle wurde nicht verwendet, da Vorarbeiten [Kösters 2002] gezeigt hatten, dass hierbei schnell Probleme hinsichtlich der Kapazität auftreten, wenn

größere Gasvolumina einkondensiert werden sollen.

Der nachgeschaltete Wärmeleitfähigkeitsdetektor bot die Möglichkeit eventuelle Durchbrüche während des Einkondensierens zu erkennen. Als Gaseinleitstück für den Purge-Gasstrom wurde eine lange LUER-Kanüle durch das Septum des Purgegefäßes gestochen, die bis in die zu purgende Flüssigkeit ragte. Zum Gasauslass diente eine entsprechend kürzere Kanüle.

Mit Hilfe einer abgeschnittenen LUER-Spritze und einer 6,35 mm (1/4“) Klemmringverschraubung (Swagelok, BEST Ventil + Fitting GmbH, Karst-Holzbüttgen) ließ sich ein simpler Adapter konstruieren, der über ein entsprechendes Reduzierstück (6,35 mm 1/4“ auf 1,59 mm (1/16“), Swagelok, BEST Ventil + Fitting GmbH, Karst-Holzbüttgen) einen Anschluss an die Gasversorgung des GC (Aux 3) ermöglichte. Während dieser über eine einfache 1,59 mm (1/16“) Edelstahlleitung realisiert werden konnte, wurde der inerte Transfer der Analyten vom Gasauslass zur Kühlfalle mit einer Sillicosteel-Leitung gleichen Durchmessers sichergestellt. Um Kondensation zu vermeiden, kann auch diese Transferleitung mit Hilfe eines Heizschlauches auf bis zu 200°C geheizt werden. Durch Umschalten eines pneumatischen 6- Wege Ventils (**V1**, Vici AG, Schwenkon, Schweiz) kann der Purgevorgang beendet werden. Nun wird der Gasfluss über die elektronische Druckkontrolle (EPC) des GC und die Spliteinstellung des Injektors geregelt.

Das Schalten des zweiten Ventils (**V2**, Vici AG, Schwenkon, Schweiz) erlaubt einen alternativen Probenaufgabeweg zur Messung von Gasproben, der weiter unten näher erläutert wird. Abbildung 3.7 im Anhang (S. 68) zeigt die jeweiligen Flusswege bei den verschiedenen Ventilstellungen. Nach der Desorption der Analyten durch Aufheizen der Kühlfalle (**T1**) mit maximal 800 °C/Min werden sie auf dem ebenfalls mit Packungsmaterial (Supelco port 2100 on mesh 80/100) gefüllten Liner im PTV Injektor refokussiert, womit dieser als zweite Kühlfalle (**T2**) fungiert. Mit der erneuten Volatilisierung durch eine schlagartige Aufheizung des Injektors beginnt die eigentliche Probenaufgabe auf die chromatographische Säule.

Beide Trapsysteme können im Routinebetrieb bis auf –130 °C gekühlt werden. Die Ventile sowie alle Aufheiz- und Kühlprozesse sind programmierbar und werden durch die GC Software (MSD ChemStation D 01.00, 2003 Agilent Technologies) gesteuert. Für die Verbindungsleitungen zwischen den Ventilen wurde Sillicosteel (AD 1,59 mm (1/16“) ID 1,0 mm) verwendet. Diese Leitungen sind zusammen mit den Ventilen von einem thermisch isolierten Gehäuse (H 16 cm x B 15 cm x T 11

cm) umschlossen, das auf dem GC plaziert ist und dessen Innenraum über einen Heizblock temperiert werden kann. Die Verbindungsleitung zum PTV Injektor musste auf ca. 4 cm außerhalb dieser geheizten Umgebung geführt werden.

Da diese Leitung direkt mit der Injektorabdeckung verschweißt ist, musste bei diesem Bauteil auch auf die innenseitige Glasbeschichtung verzichtet werden. Es wurde in Erwägung gezogen, die Leitung inklusive Injektorabdeckung nachträglich mit einer Glasschicht versehen zu lassen.

Angesichts der hohen Kosten einer solchen Spezialanfertigung wurde jedoch die Entscheidung getroffen, es auf diesem Stück bei der Edelstahloberfläche zu belassen, zumal das Risiko des Analytverlustes durch die reaktivere Oberfläche auf dem vergleichsweise kurzen Stück als eher gering anzusehen war.

#### ♦ *Off-line Aufgabe von Gasproben (über T2)*

Zur Analyse off-line gesammelter Gasproben können durch Schalten beider Ventile (**V1,V2**) separate Kühlfallen, die auch außerhalb des Labors einsetzbar sind, in den Flussweg geschaltet werden (s. Abb. 3.7). Diese U-förmigen Traps (**T2**) sind mit ca. 1,6 g Packungsmaterial gefüllt, welches ebenfalls durch Pfropfen aus Glaswolle gegen Austragung gesichert ist.

Ihr innerer Durchmesser beträgt 5 mm, der trotz der Packung hohe Flüsse erlaubt. Indem man die U-Röhrchen in Dewars mit flüssigen Stickstoff oder entsprechenden Kältemischungen, über die die Kondensationstemperatur variiert werden kann, eintaucht, erhält man robuste und variabel einsetzbare Kühlfallen. Diese können dann falls notwendig in speziellen Transport-Dewars über mehrere Tage in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Um die Analyten zu desorbieren, werden die Traps nach Entfernen des Kühlmittels über einen gewickelten Widerstandsdraht, der an einen Transformator angeschlossen wird, geheizt. Refokussierung und abschließende Probenaufgabe der Analyten im PTV Injektor erfolgt unter denselben Bedingungen wie bei der Purge & Trap Aufgabe.

Für hochgradig flüchtige Verbindungen und große Gasvolumina lässt sich auch die Kühlfalle T2, die aufgrund der direkten Stickstoffkühlung und der größeren Packung effizienter ist und eine höhere Kapazität besitzt, innerhalb des on-line Purge & Trap Prozesses nutzen.

Der Start der Refokussierung muss dann allerdings wie bei der off-line Aufgabe manuell durch Entfernen des Stickstoffdewars und Einschalten eines Transformators zur induktiven Heizung des gewickelten Widerstandsdrahtes erfolgen.

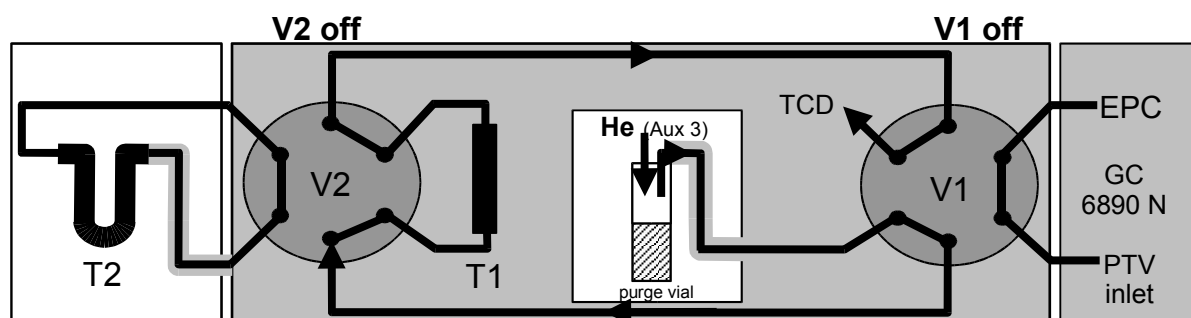
Bei der Konzeption beider Probenaufgabevarianten wurde das Prinzip angewendet, zunächst auf einer Falle mit größerem Durchmesser zu trappen und erst in einem zweiten Schritt die Analyten auf das Kapillarsystem aufzugeben

Dieses bietet den Vorteil zunächst große Probenvolumina in kurzer Zeit durch die Falle strömen lassen zu können, da der Fluss nicht durch die Restriktion des Kapillarsystem limitiert ist. Durch die Variation der Kondensationstemperatur ist zudem in vielen Fällen eine selektive Abtrennung störender Matrixgase möglich und die Retentionszeiten sind durch die Refokussierung unabhängig von der Probenaufgabe, die der Thermodesorption im PTV vorgeschaltet ist.

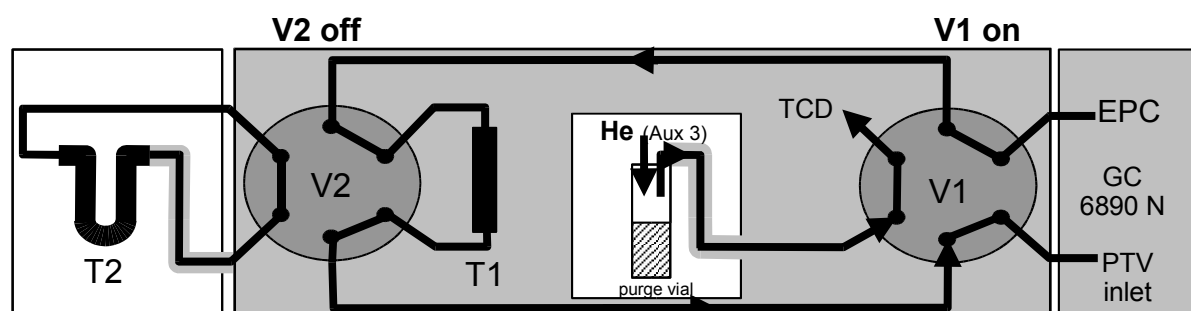
Bei gleichen Temperaturprogrammen können daher Chromatogramme beider beschriebenen Aufgabevarianten direkt miteinander verglichen werden

Wie sich aber im Laufe der Arbeit zeigte, ließ sich die nach diesem Konzept angestrebte splitlose Aufgabe durch den PTV Injektor aus technischen Gründen nicht realisieren. Zum einen sorgte der hohe Druck, der sich durch die Desorption des einkondensierten Volumens bei geschlossenem Split bildet, für eine Verschlechterung der chromatographischen Auflösung bei den leicht flüchtigen Komponenten. Zum anderen waren mengenmäßig kaum Unterschiede zwischen splitloser Aufgabe und einer Desorption bei einem geringen Split (z.B. 5:1) zu detektieren. Das lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass aufgrund des extremen Drucks ein Teil der Analyten über die Öffnung der Septum-Spülvorrichtung (Septum Purge) aus dem Injektor entweichen kann.

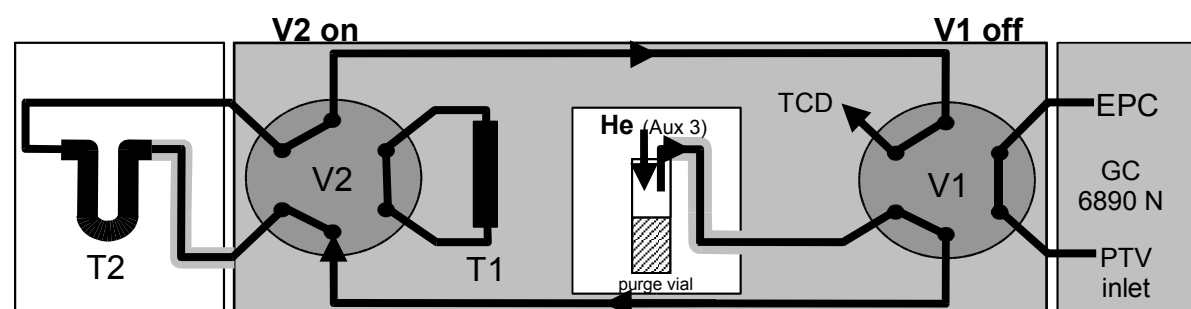
Für die gezeigten Anwendungen war die Trap-Effizienz mit geringem Injektorsplit aber ausreichend. Zudem ließen sich dadurch höhere Gasflüsse und somit auch ein effizienterer Transport gewährleisten.



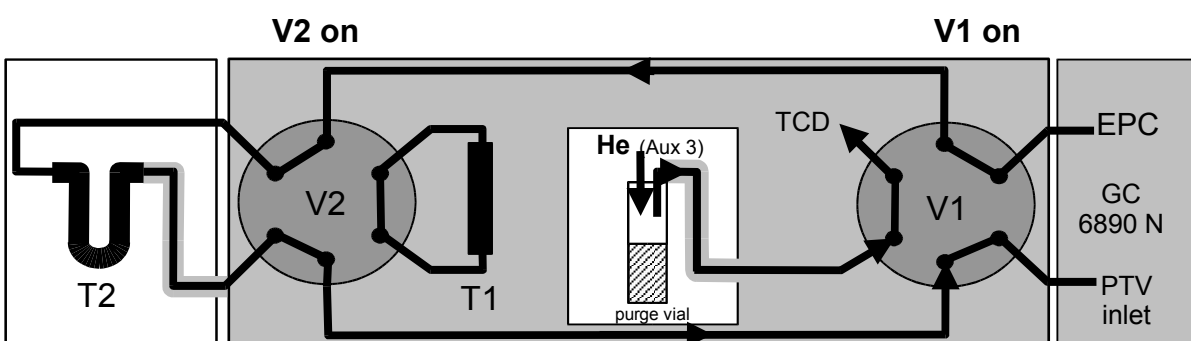
A) Purge &amp; Trap auf Kühlfalle T1



B) Refokussierung von Kühlfalle T1 auf den Liner im PTV Injektor



C) Purge &amp; Trap auf Kühlfalle T2 (U-Rohr)



D) Refokussierung (manuell gestartet) von Kühlfalle T2 (U-Rohr) auf den Liner im PTV Injektor (off-line gesammelte Gasprobe oder nach P &amp; T)

Abbildung 3.7: Flusswege bei den unterschiedlichen Ventilstellungen. Erkl. der Abk. s. Abb. 3.6 S. 64



### 3.3.3 Beurteilung des automatisierten Purge & Trap Systems

Zur Bewertung der Effizienz sowie der chromatographischen und quantitativen Reproduzierbarkeit des Purge & Trap Systems wurden in Wiederholungsexperimenten die relativen Standardabweichungen der Signalfächen und Retentionszeiten nach Purge & Trap Aufgabe mit den entsprechenden Ergebnissen nach direkter Injektion von Flüssigstandards via Autosampler verglichen.

Zu diesem Zweck wurden erneut die bereits in Kapitel 3.2.3 (S. 52) verwendeten Iodalkane eingesetzt. Dabei wurden diese Standards neu angesetzt um zu überprüfen, ob die beobachteten Verluste, wie vermutet, auf Verdampfung während der Verdünnung zurückzuführen sind.

#### ♦ Experimentelles

Jeweils 100 µL Iodmethan, Iodethan, 2-Iodpropan und 2-Iodpropan wurden mit 1-Oktanol in einem Mischstandard im Verhältnis 1:100000 verdünnt.

Trotz des Oktanols als polarem Lösungsmittel, und der damit gegenüber dem Dekan verbesserten Solvatisierungseigenschaften, sowie konsequenter Kühlung der Flüssigkeiten, konnte auch bei diesem Experiment ein Verdampfungsverlust der leichter flüchtigen Iodalkane nicht vermieden werden.

Dieses zeigte eine Überprüfung der pipettierten Volumen durch Wägekontrolle aufgrund der in Kapitel 3.2.3 (S. 59) aufgeworfenen Vermutungen.

Die folgende Tabelle 3.9 fasst die entsprechenden Daten zusammen und zeigt den prozentualen Verdampfungsverlust, der aus dem Vergleich von theoretischem und gemessenem Gewicht des mittels Pipette zugegebenen Standards berechnet wurde.

Tabelle 3.9: Berechnung des Verdampfungsverlustes beim Ansetzen der Verdünnung

	Dichte	Theoretische Masse 100 µL [g]	gewogene Masse [g]	Verdampfungsverlust
Iodmethan	2,28	0,228	0,184	19%
Iodethan	1,94	0,194	0,183	6%
2-Iodpropan	1,70	0,17	0,166	2%
1-Iodpropan	1,74	0,174	0,172	1%

Jeweils 1  $\mu\text{L}$  des Iodalkanstandards wurde dann direkt via Autosampler injiziert bzw. in 3 mL Wasser gegeben und mit Hilfe der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Purge & Trap Technik aufgegeben.

im Folgenden werden die entsprechenden Aufgabebedingungen erläutert, die bei diesem Experiment gewählt wurden.

- *Bedingungen für die Purge & Trap Aufgabe*

Die Analyten wurden mit einem Helium Purgefluss von 12 mL/Min (200 kPa über Aux 3) auf die erste Kühlfalle (T1, Abb. 3.6 S. 64) gespült. Transferleitung und Ventilgehäuse wurden dabei auf 150°C geheizt.

Nach 5 Minuten Trapzeit bei – 100°C wurde Ventil 1 (V1, Abb. 3.6 S. 64) pneumatisch geschaltet und T1 mit 800 °C/Min auf 230°C geheizt. Die desorbierenden Analyten wurden mit einem rechnerischen Heliumfluss von 30 mL/Min (Injektorsplit 5:1, Säulenfluss 5 mL/Min über EPC) bei –100°C im PTV Injektor refokussiert.

Die eigentliche Probenaufgabe auf die chromatographische Säule wurde nach weiteren 5 Minuten durch programmiertes Heizen des Injektors mit der maximalen Rate von 800 °C/Min gestartet. Für diese Untersuchung wurden fünf Wiederholungsmessungen betrachtet.

- *Bedingungen für die Flüssiginjektion*

1  $\mu\text{L}$  des oben erwähnten Iodalkanmixes in Oktanol wurde mit einer 10  $\mu\text{L}$  Spritze via Autosampler in den 250°C heißen Injektor eingespritzt. Es wurden ebenfalls fünf Wiederholungsmessungen bei einem Injektorsplit von 5:1 durchgeführt.

Die Standardabweichungen (SD) der Retentionszeiten sowie die relativen Standardabweichungen (RSD) der Peakflächen wurden für die beiden untersuchten Probeaufgabetechniken verglichen. Zur Ermittlung der Effizienz des Purge & Trap Systems wurden die jeweiligen Mittelwerte der Peakflächen nach Integration der ICP-MS Chromatogramme ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 3.10 fasst die Bedingungen der Probenaufgabevarianten sowie weitere chromatographische Parameter zusammen. Einzelheiten zu den Detektoren und dem Transport der Analyten nach der chromatographischen Trennung wurden in

Kapitel 3.2.2 charakterisiert. Die entsprechenden Betriebsparameter sind in Tabelle 3.4 (S. 54) aufgeführt.

*Tabelle 3.10: Probenaufgabebedingungen sowie GC Parameter für den Vergleich von Purge & Trap Aufgabe und direkter Flüssiginjektion der Iodalkane.*

#### **Purge & Trap**

<b>Säule</b>	HP – 5 MS, 0.25 mm x 30 m 25 µm	
<b>Trägergas</b>	Helium, 5 mL/Min (constant flow)	
<b>Injektor Bedingungen (Back Inlet, PTV)</b>	Splitverhältnis	5:1
	Starttemperatur	-100°C
	Heizrate	800°C/Min
	Endtemperatur	230°C (11 Min)
<b>Ofen (Temperaturprogramm)</b>	Starttemperatur	40°C für 1 Min
	Heizrate 1	100°C/Min
	Endtemperatur 1	110°C für 1 Min
	Heizrate 2	100°C/Min
	Endtemperatur 2	280°C

#### **Flüssiginjektion**

<b>Säule</b>	HP – 5MS, 0.25 mm x 30 m 25 µm	
<b>Trägergas</b>	Helium, 5 mL/Min (constant flow)	
<b>Injektor Bedingungen (Back Inlet, PTV)</b>	Splitverhältnis	5:1
	Starttemperatur	250°C
<b>Ofen (Temperaturprogramm)</b>	Starttemperatur	40°C für 1 Min
	Heizrate 1	100°C/Min
	Endtemperatur 1	110°C für 1 Min
	Heizrate 2	100°C/Min
	Endtemperatur 2	280°C

♦ *Ergebnisse der Wiederholungsexperimente zum Vergleich der Probenaufgabetechniken*

Die Retentionszeiten zeigten für beide Aufgabevarianten eine hervorragende Reproduzierbarkeit, die sich durch Standardabweichungen von 0,12 Sekunden und darunter auszeichnete.

Die relativen Standardabweichungen (RSD) der Peakflächen lagen für die Purge & Trap Aufgabe mittels automatisiertem Kaltaufgabesystem zwischen 6,3 und 7,6 %. Mit Hilfe des automatischen Probengebers konnte *via* Flüssiginjektion selbstverständlich eine höhere Präzision erreicht werden. Hier wurden mit fallender Tendenz proportional zur Flüchtigkeit relative Standardabweichungen zwischen 3,1 und 1,6 % ermittelt.

Die Peakflächen pro Nanogramm Iod schwankten im Falle der Purge & Trap Aufgabe mit einer relativen Standardabweichung von 3,1 % um ihren Mittelwert. Für die Flüssiginjektion lag dieser Wert bei 4,0 %.

Die relative Effizienz der Purge & Trap Aufgabe im Vergleich zur direkten Injektion lag für Iodmethan, Iodethan und 2-Iodpropan bei ca. 90 %. Lediglich 1-Iodpropan wies mit 83 % eine etwas geringere Überführungsrate auf. In Tabelle 3.11 sind diese Daten zusammenfassend gegenübergestellt.

Tabelle 3.11: Vergleich von Purge &amp; Trap Aufgabe und Flüssiginjektion (ICP-MS-Daten)

	Iodmethan	Iodethan	2-Iodpropan	1-Iodpropan
<b>Aufgegebene Menge bezogen auf Iod [ng]</b>	16,5	14,9	12,4	12,8
<b>Purge &amp; Trap</b>				
SD <sub>RT</sub> [Sek]	0,118	0,001	0,097	0,001
Peakflächen	772785	729393	562680	603577
RSD <sub>Fläche</sub> [%]	6,3	7,0	6,9	7,6
Peakfläche/ng Iod [ng <sup>-1</sup> ]	46960	48959	45373	46973
RSD <sub>Peakfläche/ng Iod</sub> [%]			3,1	
<b>Flüssiginjektion</b>				
SD <sub>RT</sub> [Sek]	0,096	0,001	0,001	0,001
Peakflächen	874636	823634	643025	728502
RSD <sub>Fläche</sub> [%]	3,1	2,5	1,9	1,6
Peakfläche/ng Iod [ng <sup>-1</sup> ]	53149	55285	51852	56695
RSD <sub>Peakfläche/ng Iod</sub> [%]			4,0	
<b>Effizienz P&amp;T/FI [%]</b>	88	89	88	83
<b>Siedepunkt [°C]</b>	42-43	71-72	88-90	100-102

♦ *Diskussion und Beurteilung der verglichenen Aufgabetechniken*

Die Tatsache, dass die Purge & Trap Aufgabe in der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten nur minimal schlechtere Werte lieferte als die direkte Injektion über den Autosampler, bestätigt das Konzept der Refokussierung im PTV und anschließenden Probendesorption unter automatisierten Bedingungen, die durch die GC Steuerungssoftware kontrolliert werden können.

Hierdurch ist es gelungen, hinsichtlich eines konstanten Startzeitpunktes vergleichbare Probenaufgabebedingungen zu schaffen und somit präzise und verlässliche Retentionszeiten für die Kaltaufgabe zu etablieren.

Die Ergebnisse der Kalibration nach Flüssiginjektion der in Dekan verdünnten Standards (s. Kap. 3.2.3 S. 54 und Tab. 3.5 S. 55) wiesen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Peakflächen mit relativen Standardabweichungen bis zu 0,31 % zum Teil eine sehr gute Reproduzierbarkeit auf. Diese schwankte jedoch mit maximal 7,5 % relativ stark und zeigte im Vergleich von EI-MS und ICP-MS Detektion keine signifikanten Unterschiede. Das ließ darauf schließen, dass die

Präzision der Methode hauptsächlich von der Probenaufgabe und nicht durch die Detektionssysteme beeinflusst wird.

Die diesbezüglichen Ergebnisse der vergleichenden Wiederholungsexperimente belegen diese Schlussfolgerung, da sie hinsichtlich der Reproduzierbarkeit mit relativen Standardabweichungen von durchschnittlich 6,9 % für die Purge & Trap Aufgabe bzw. 2,3 % bei der direkten Injektion Unterschiede für die verschiedenen Probeaufgabetechniken zeigten.

Absolut gesehen waren aber auch diese Daten als Maß für die quantitative Präzision des Purge & Trap Aufgabesystems mehr als zufriedenstellend, zieht man die potentiellen Verlustquellen bei der gas/flüssig Separation sowie der wiederholten Einkondensierung in Betracht.

Gleiches gilt auch für die Effizienz des Systems. Hier konnte nur für das 1-Iodpropan mit einer Gesamtüberführungseffizienz von 83 % ein leichter Einfluss der geringeren Flüchtigkeit beobachtet werden, da diese sich negativ auf die Effizienz der gas/flüssig Separation in der wässrigen Phase auswirkt.

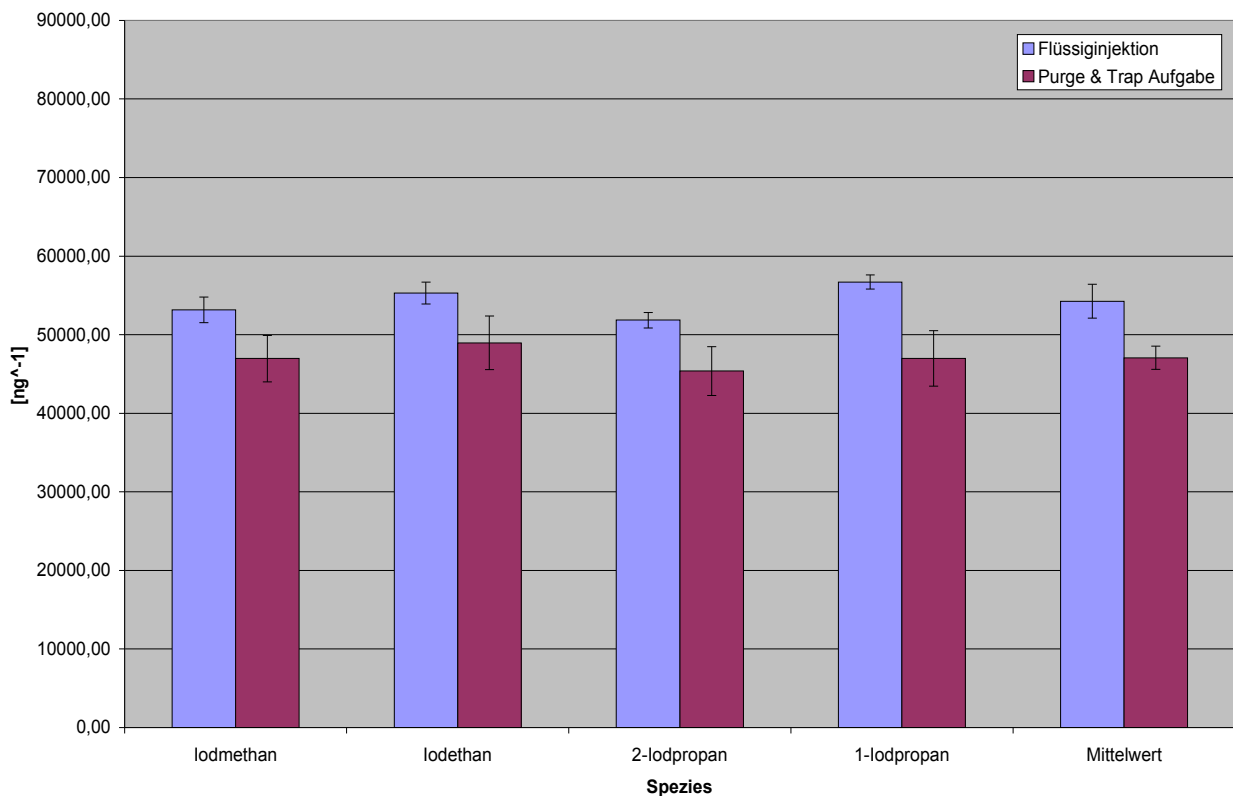
Für die übrigen untersuchten Verbindungen ließ sich diesbezüglich keinerlei Effekt erkennen. Dieses ist vermutlich auf das für dieses Experiment gewählte, stark hydrophobe Lösungsmittel Oktanol zurückzuführen, welches eine Durchmischung mit der wässrigen Phase möglichst verhindern sollte, um so die Trapeffizienz des Kaltaufgabesystems weitestgehend unabhängig von der Effizienz der gas/flüssig Separation beurteilen zu können.

Die Ergebnisse zeigen, dass dieses gelungen ist und dementsprechend die Trapeffizienz im untersuchten Siedepunktbereich mit einer Verlustrate von ca. 10 % relativ zur direkten Injektion als sehr befriedigend bewertet werden kann.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Flüssiginjektion in aller Regel einen Extraktionsschritt voraussetzt, der ebenfalls zu Verlusten führen kann.

Als ein weiteres Maß für die Empfindlichkeit konnten die auf die korrigierten Iodmengen bezogenen Peakflächen in diesem Experiment die Vermutung bestätigen, dass der Verdampfungsverlust zu den scheinbar niedrigeren Empfindlichkeiten der ICP-MS (s. Kap. 3.2.3 S. 59) geführt hat: Denn wie in Abbildung 3.8 (S. 75) veranschaulicht wird, zeigten die normierten Signalfächen für sämtliche Iodalkane mit relativen Standardabweichungen von 3,1 % bei der direkten Injektion und 4,0 % nach Purge & Trap Aufgabe nur eine geringe Schwankung um ihren jeweiligen Mittelwert.

Im Fall der Purge & Trap Aufgabe lag dieser Wert sogar unterhalb der Schwankungsbreiten, die für die Flächen der einzelnen Spezies ermittelt worden waren, weshalb von einer speziesunspezifischen Signalantwort gesprochen werden kann. Eine signifikante detektorseitige Sensitivitätsdiskriminierung hinsichtlich verschiedener Spezies eines Elements kann daher ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.8:** Vergleich der auf die aufgegebene Iodmenge normierten Peakflächen und der jeweiligen Mittelwerte als Empfindlichkeitsmaß für die Flüssiginjektion und die Purge & Trap Aufgabe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem vorgestellten Kaltaufgabesystem für das untersuchte Siedepunktspektrum eine weitestgehend automatisierte Probenaufgabetechnik entwickelt wurde, die hinsichtlich quantitativer und chromatographischer Präzision als auch in der Überföhrungseffizienz der direkten Injektion via Autosampler nahezu ebenbürtig ist. Für Verbindungen mit höheren Siedepunkten ist selbstverständlich die direkte Injektion in der Regel vorteilhafter, da die flüssig/flüssig Extraktion mit steigendem Siedepunkt deutlich effizienter wird als die gas/flüssig Separation.

Wie die Anwendungen in Kapitel 4 unter anderem anhand der Analytik von Arsin- und Stibinspezies belegen, ist das Purge & Trap System auch für weitaus flüchtigere Verbindungen zur Probenaufgabe konzipiert und geeignet.

Für quantitative Betrachtungen sollte aber die jeweilige Überführungseffizienz geprüft oder unter Verwendung des Kaltaufgabesystems eine externe Kalibration durchgeführt werden. Sollte die Trapeffizienz zu gering sein, besteht mit der alternativen U-förmigen Kühlfalle, die direkt in flüssigen Stickstoff getaucht wird und mit mehr Packungsmaterial gefüllt ist, für den ersten Einkondensierungsschritt eine Möglichkeit diese Effizienz deutlich zu erhöhen (s. Kap. 3.3.2 S.66).



## 4 Anwendbarkeit und Potential der Methode

Eine wichtige Motivation für die Entwicklung der vorgestellten Methode zur simultanen Erfassung elementspezifischer und molekülspezifischer Informationen war, wie einleitend erwähnt, die Problematik mittels GC/ICP-MS neue und unbekannte Spezies zu identifizieren bzw. vermutete Verbindungen zu verifizieren. Denn aufgrund der rein elementspezifischen Detektion ist eine strukturelle Zuordnung, wenn überhaupt, nur indirekt möglich und häufig umständlich sowie anfällig für Fehlinterpretationen.

Nicht zuletzt aufgrund der neuen Anforderungen durch die Forschergruppe war dementsprechend für eine routinemäßige sowie zuverlässige Identifikation und Verifizierung bekannter und unbekannter Spezies, die Integration strukturaufklärender Methoden dringend erforderlich.

Die im Folgenden präsentierten Studien sollen exemplarisch für die große Zahl der möglichen Anwendungsbereiche die Vielseitigkeit der Methode demonstrieren und das Potential der beschriebenen GC/ICP-MS/EI-MS Kopplung hinsichtlich der an diese Methode gestellten Anforderungen verdeutlichen. Diese Untersuchungen können und sollen dementsprechend an dieser Stelle nur in Auszügen und auf ihre wesentlichen Aussagen reduziert vorgestellt werden.

Neben einer kurzen Einleitung zum Hintergrund der entsprechenden Studie und den Zielen der jeweiligen Experimente wurden die wichtigsten experimentellen Details erörtert, bevor die hinsichtlich der Anwendung der Methode relevanten Ergebnisse präsentiert und diskutiert werden.

Die hierbei nachgewiesenen Verbindungen wurden bereits in der Literatur beschrieben (vgl. [Dopp et al. 2004]). Die entsprechende Verifizierung durch molekülspezifische Methoden, wie in dieser Arbeit anhand von EI-MS Spektren durchgeführt, konnte dort allerdings nur in Ausnahmefällen berichtet werden.

#### **4.1 Identifizierung und Verifizierung von Stoffwechselprodukten in mikrobiologischen Prozessen**

Ein Teilprojekt der Forschergruppe (G1/Mikrobiologie) befasst sich mit der Untersuchung der Fähigkeit verschiedener Mikroorganismen zur Biomethylierung von Metall(oid)en.

In diesem Zusammenhang sollte mit der entwickelten Kopplungsmethode die Anwesenheit ionischer Zwischenstufen bei der Methylierung von Bismut in Zellfrei-Extrakten von *Methanobacterium formicicum* untersucht und deren strukturelle Identität geklärt werden (Studie I).

Um die vermuteten ionischen Bismutspezies der gaschromatographischen Analyse zugänglich zu machen wurde getestet, ob die direkte Ethylierung mit Hilfe von Natriumethylborat (NaTeEB) geeignet ist diese Verbindungen zu verflüchtigen, wie es in der Literatur bereits für Blei, Quecksilber und Zinn beschrieben wurde [Demuth und Heumann 2001].

Da die Hydrierung mit  $\text{NaBH}_4$  zur Derivatisierung anorganischer Bismutverbindungen verwendet wird und über die Hydrierung von Methylbismutverbindungen in Sedimenten [Krupp et al. 1996] und Urinproben [Hirner et al. 2004] berichtet wurde, sollte auch die Anwendbarkeit dieser Technik für die vorliegende Probenmatrix untersucht werden.

Zur Untersuchung der Biomethylierungsfähigkeit von Mikroorganismen aus unterschiedlichen Habitaten wurden in einer weiteren Studie unter anderem verschiedene Reinkulturen methanogener Organismen sowie Umweltisolate auf ihre Fähigkeiten überprüft Metall(oid)e zu volatilisieren (Studie II). In Vorversuchen sollte getestet werden, ob die parallele Detektion mit EI-MS und ICP-MS hierbei in der Lage ist zur Identifizierung unbekannter Stoffwechselprodukte in der Gasphase beizutragen und Spezies, deren Strukturen anhand von Retentionszeit-Siedepunkt-Korrelation vermutet wurden, zu verifizieren.

##### ♦ Experimentelles

###### *Studie I:*

Die Zellfreiextrakte von *Methanobacterium formicicum* wurden in einem 20 mL Headspace-Gefäß mit 1 mM DTT (1,4-Dithio-D,L,-Threitol, GERBU Biochemicals GmbH, Gaiberg), 50 mM GSH (L-Glutathion, Serva Electrophoresis GmbH), 0,75 mM

CH<sub>3</sub>B12 (Methylcobalamin, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), 50 mM HEPES-Puffer (N-2-Hydroxyethylpiperazin, GERBU Biochemicals GmbH, Gaiberg) (pH 7) und 10 µM Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Sigma Aldrich, Taufenkirchen) versetzt. [pers. Mitteilung, K. Michalke]  
 Nach der in Kapitel 3.3.2 (Seite 64 ff.) beschriebenen Purge & Trap Aufgabe und der Trennung im GC wurden zunächst die flüchtigen Bestandteile der Lösung im ICP-MS und EI-MS Detektor erfasst. Danach wurde dieselbe Probe mit 10 µL wässriger NaTeEB-Lösung (1% w/w) versetzt. Zur Hydrierung wurde eine weitere Probe mit 20 µL NaBH<sub>4</sub> versetzt und analog vermessen.

Die derivatisierten Analyten wurden daraufhin ebenfalls über das Purge & Trap System aufgegeben, gaschromatographisch getrennt und parallel detektiert. Die Purgezeit für die beiden Trapvorgänge betrug jeweils 5 Minuten. Die eigentliche Probenaufgabe beginnt daher erst nach 10 Minuten, was bei der Betrachtung der Retentionszeiten entsprechend berücksichtigt werden muss.

## Studie II

Zur Untersuchung ihrer Fähigkeit zur Volatilisierung von Metall(oid)en wurden verschiedene Reinkulturen methanogener Organismen sowie Umweltisolate in Gegenwart der Elemente Selen, Tellur, Arsen, Antimon, Bismut und Quecksilber inkubiert.

Für die vorliegende Studie wurden die methanogenen Organismen (Methanoarchaea) *Methanlobus tindarius* (DSM-Nr. 2278)<sup>a)</sup>, *Methanosphaera stadtmanae* (DSM-Nr. 3091)<sup>a)</sup>, *Methanococcus vanniellii* (DSM-Nr. 1224)<sup>a)</sup>, *Methanoplanus limicola* (DSM-Nr. 2279)<sup>a)</sup> und *Methanobrevibacter smithii* (DSM-Nr. 2375)<sup>a)</sup> und ein Bodenisolat mit der Bezeichnung ASI-1 (isoliert aus einem Auengley) untersucht.

Letzteres wurde in einem 250 mL Inkubationsgefäß unter anaeroben Bedingungen kultiviert und über ein Septum mit 1-10 µg Selendioxyd (SeO<sub>2</sub>) versetzt.

Die Methanoarchaea wurden in 120 mL Gefäßen auf die gleiche Art kultiviert, jedoch mit einer Multielementlösung inkubiert, die 10 µM an SeO<sub>2</sub>, TeO<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>, SbCl<sub>3</sub>, Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> und HgCl<sub>2</sub> enthält. Ein weiterer Ansatz wurde mit einer 1 µM Lösung von H<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>, SbCl<sub>3</sub> und Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> versetzt [pers. Komm. J. Meyer].

Um den Gasraum zu analysieren wurden die Inkubationsgefäße statt der ansonsten verwendeten 20 mL Gefäße mit dem Gaseinleitstück (Aux 3) und dem Gasauslass versehen und bei der entsprechenden Ventilstellung ((s. Abb. 3.7 C) S.68) für 5

a) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen: [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)

Minuten mit Helium on-line auf die bereits eingebaute U-Rohr Kühlfalle (T2) gepurged. Diese Aufgabevariante mit flüssigem Stickstoff als Kühlmittel (s. Kap. 3.3.2 S. 66) wurde verwendet, um die relativ große Gasmenge effizient einkondensieren zu können. Alle weiteren Parameter für diesen ersten Purge & Trap Schritt wurden bereits in Kapitel 3.3.3 (S. 70) erläutert.

Der um die Kühlfalle gewickelte Widerstandsdraht wurde an einen Trafo angeschlossen und die Refokussierung bei Start des Programms manuell durch Entfernen des Stickstoffdewars und Einschalten des Trafos zur Heizung des Widerstandsdrahtes gestartet.

Da der erste Purge & Trap Schritt vor dem Start des chromatographischen Programms stattfand, verkürzte sich dieses um 5 Minuten.

Für die eigentliche Probenaufgabe durch die Thermodesorption im PTV blieben die Parameter in beiden Studien unverändert gegenüber den zuvor beschriebenen Einstellungen (s. Tab. 3.10 S.71).

Alle weiteren Parameter hinsichtlich Chromatographie- und Detektionsbedingungen entsprechen den in Tabelle 3.10 (S. 71) und Tabelle 3.4 (S. 54) aufgelisteten Daten.

Das für die EI-MS Detektion verwendete Massenfenster lag für beide Studien zwischen  $m/z$  30 und  $m/z$  350. Für die Detektion der zu untersuchenden Elemente im ICP-MS wurden die Massen 75 (As), 77/82 (Se), 121 (Sb), 125 (Te), 202 (Hg), 209 (Bi) gewählt. Die Massenspur 82, auf der sich ebenfalls ein Isotop des Selens befindet, wurde zusätzlich betrachtet, um zu vermeiden, dass Signalinterferenzen auf der Masse 77 fälschlicherweise als Selenverbindung interpretiert werden.

## ◆ Ergebnisse

### Studie I

Als Ergebnis des Purgeversuchs ohne Derivatisierung konnte die Verifizierung des Trimethylbismuts (TMBi) mit Hilfe eines Massenspektrums und entsprechendem Vergleichsspektrum aus der Datenbank (s. Abb.8.8 S.141) durchgeführt werden. Darüber hinaus gelang es teilmethylierte Bismutspezies ( $\text{MMBi}^{2+}$ ,  $\text{DMBi}^{+}$ ) als Ethylderivate zu detektieren und ihre Struktur mit Hilfe von Spektren zu belegen. Nicht umgesetztes  $\text{Bi}^{3+}$  konnte als TEBi nachgewiesen werden (s. Abb. 8.9 S.141). Abbildung 4.1 zeigt das EI-MS Chromatogramm und die Massenspektren der derivatisierten Verbindungen.

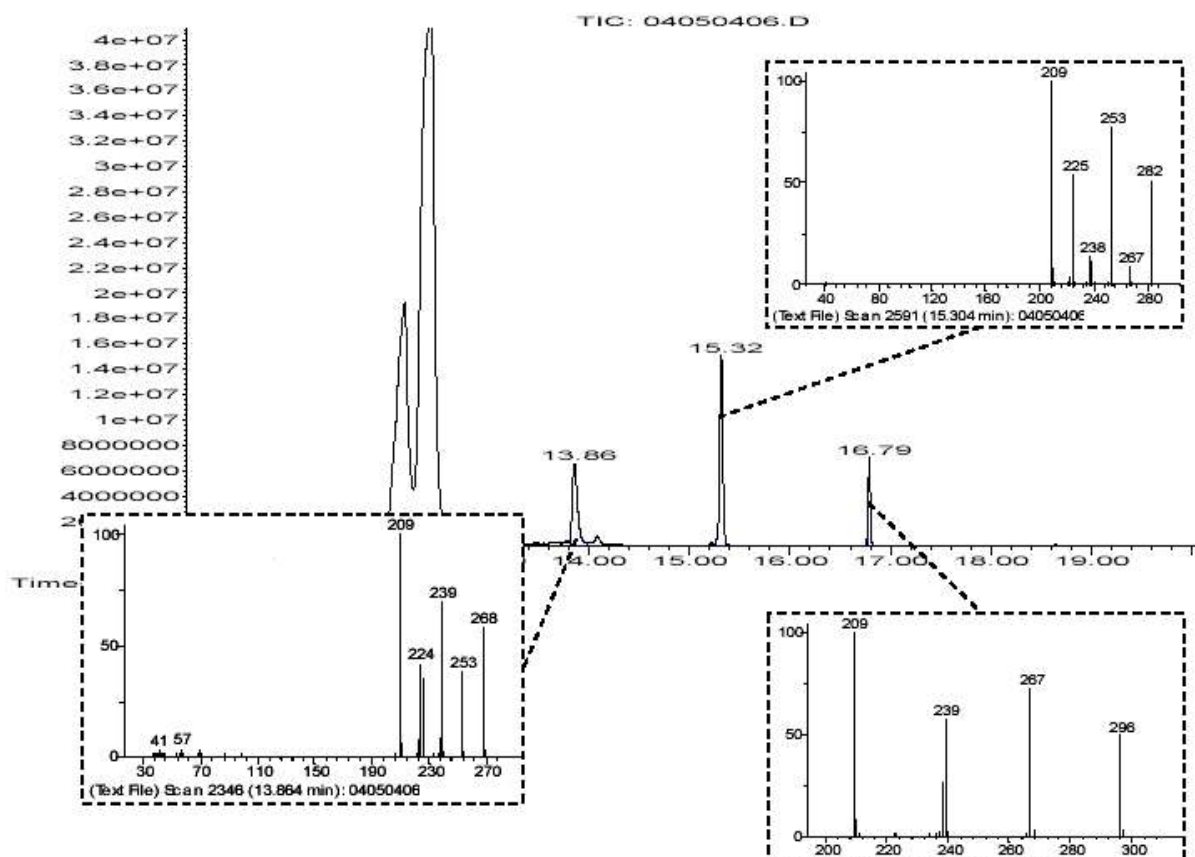


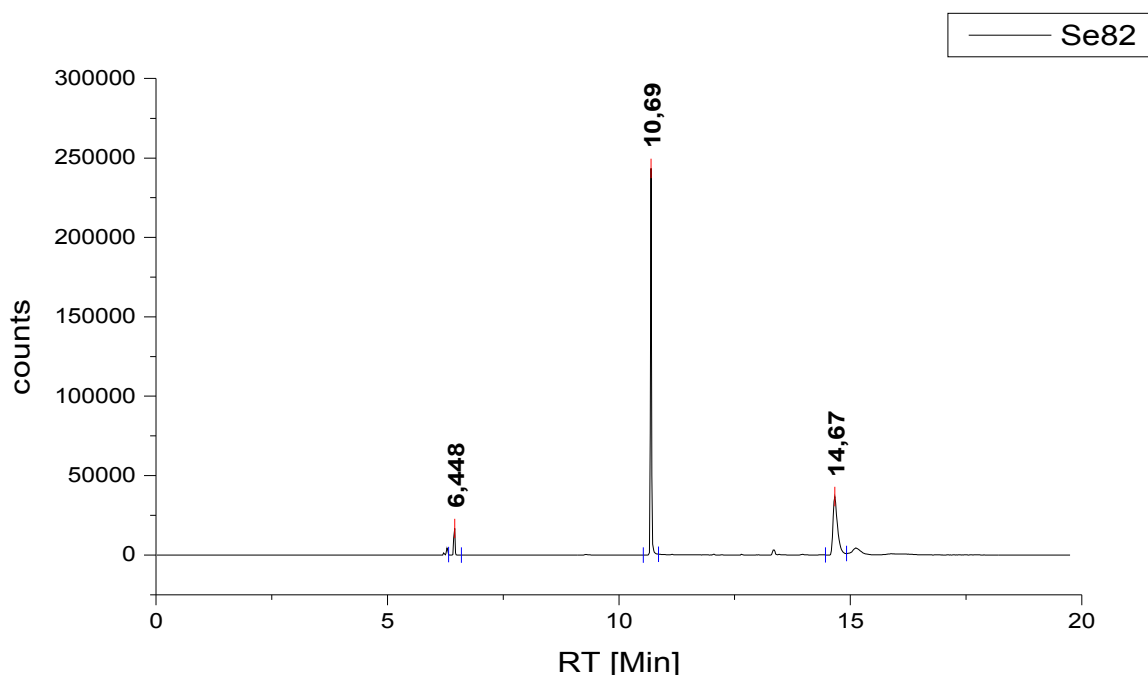
Abbildung 4.1: a) EI-MS-Chromatogramm des ethylierten Zellfreiextraktes von *M. formicicum* nach P & T Aufgabe (Darstellung m. Enhanced Data Analysis d. MSD ChemStation) sowie Massenspektren von b) MEDMBi, c) DEMMBi und d) TEBi

Die Hydrierung in der untersuchten Matrix war hinsichtlich der Derivatisierung der Methylbismutverbindungen nicht erfolgreich.

Eine Ursache hierfür könnte der pH Wert gewesen sein, der aufgrund des HEPES Puffers bei fünf lag. Da aber die Ethylierung sehr erfolgreich und aufgrund der geringeren Gas- und Schaumentwicklung mit der entwickelten Methodik einfacher durchzuführen war, wurde im Folgenden die Ethylierung angewendet.

### Studie II

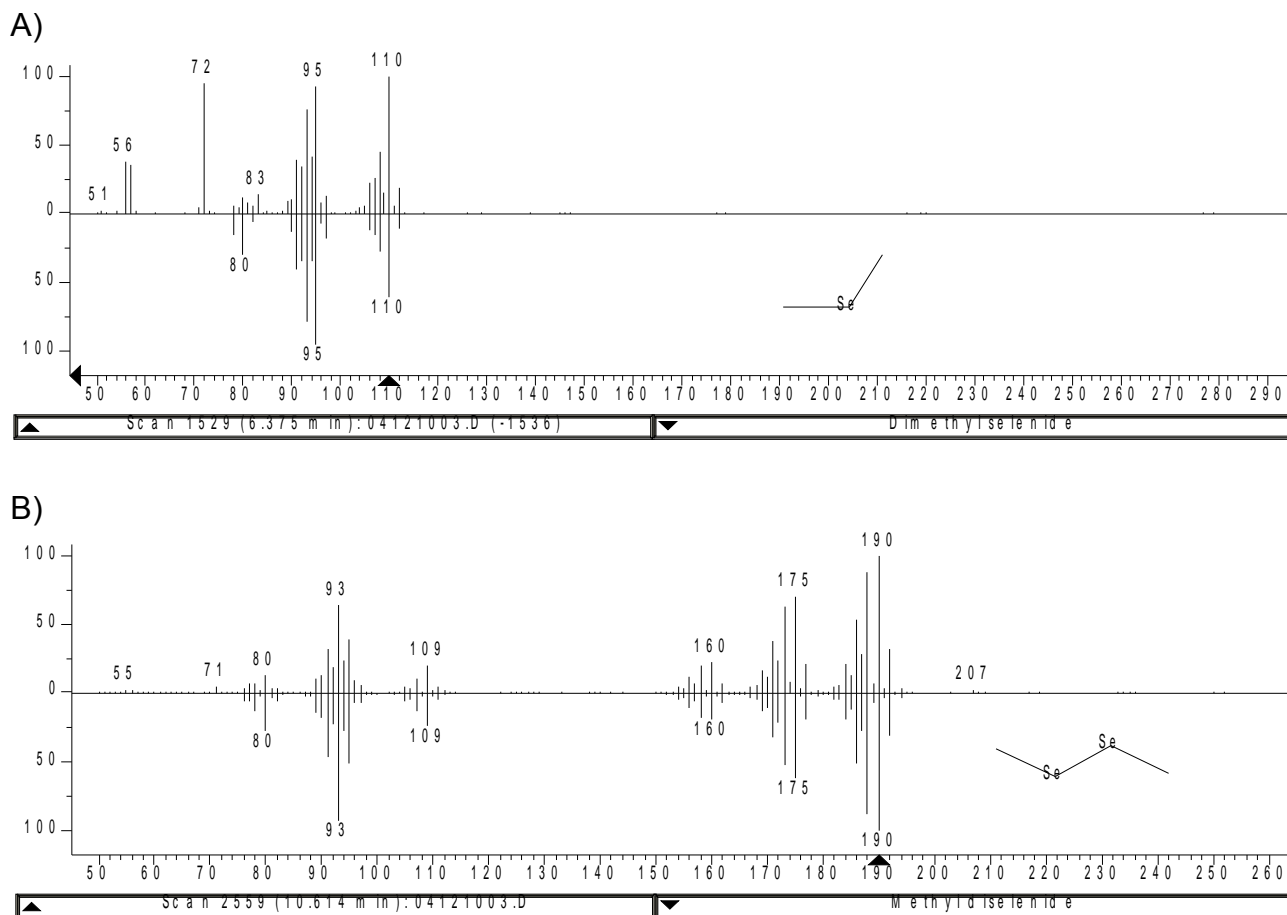
Für die Kultur ASI-1 konnte die Umsetzung des anorganischen Selens in verschiedene flüchtige Selenderivate gezeigt werden. Abbildung 4.2 gibt das Chromatogramm dieser Messung wieder, und lässt im Wesentlichen drei größere Peaks erkennen, die auf drei verschiedene Selenspezies hindeuten.



**Abbildung 4.2:** ICP-MS Chromatogramm der Messung des Gasraums über ASI-1 nach Inkubation mit  $\text{SeO}_2$

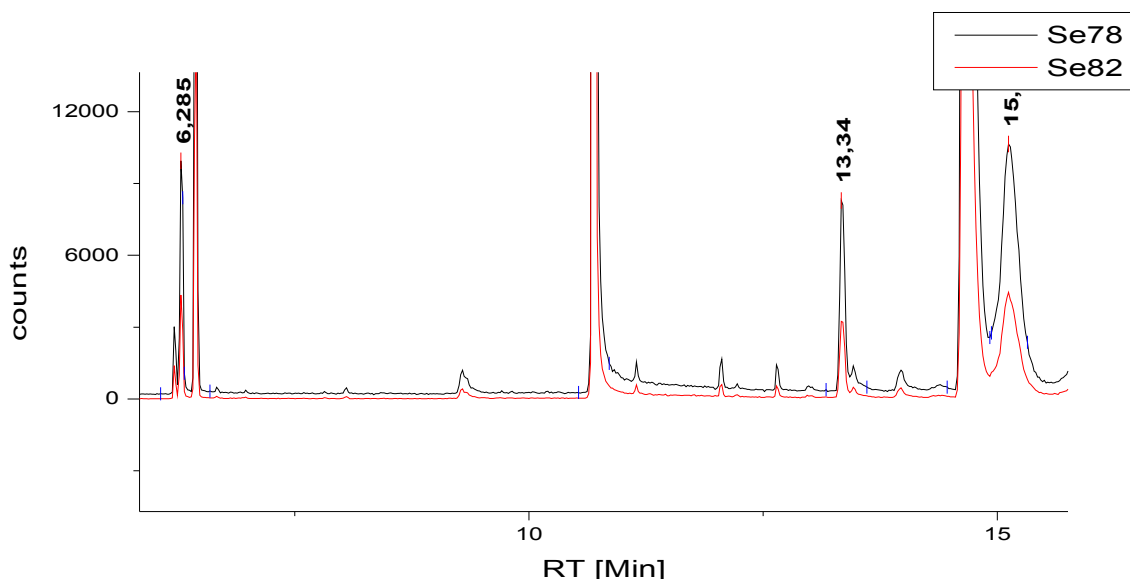
Die ersten beiden Peaks konnten anhand ihrer Massenspektren aus der EI-MS Detektion und den zugehörigen Vergleichsspektren aus der Bibliothek (s. Abb. 4.3 S, 83) als Dimethylselen (RT 6,448 Min) und Dimethyldiselen (RT 10,69 Min) bestätigt

werden. Obwohl der dritte Peak (RT 14,67 Min) eine höhere Signalstärke aufwies als der des Dimethylselen, konnte aufgrund von Überlagerungen durch andere Komponenten dieser Retentionszeit kein eindeutiges EI-Massenspektrum zugeordnet werden, sodass eine Identifizierung dieser Verbindung nicht möglich war.



**Abbildung 4.3: EI-MS Spektrum und Vergleichspektrum aus der Bibliothek von A) Dimethylselen und B) Dimethyldiselen nach Purge & Trap Messung des Gasraums ASI-1**

Der vergrößerte Ausschnitt aus diesem Chromatogramm (s. Abb. 4.4) lässt erkennen, dass neben drei weiteren markierten Peaks eine Vielzahl kleinerer Signale auf weitere im Gasraum vorhandene Selenspezies hindeuten. Für eine Zuordnung der EI-Massenspektren war aber die Signalintensität zu gering beziehungsweise die Überlagerungen durch die Fragmentationen koeluerender Matrixkomponenten zu stark.



**Abbildung 4.4:** Vergrößerter Ausschnitt aus dem in Abbildung 4.2 gezeigten Chromatogramm mit paralleler Darstellung der Massenspektren  $m/z$  78 und 82.

In den Untersuchungen der in Gegenwart der Metall(oid)e inkubierten Archaea konnten Dimethylselen (DMSe), Trimethylantimon (TMSb) und Trimethylbismut (TMBi) anhand von Bibliotheksspektren sowie Dimethyltellur (DMTe), aufgrund des charakteristischen Isotopenmusters identifiziert werden. Die entsprechenden Fragmentmassenspektren wurden bereits (TMSb, Abb.8.1 S. 135; DMTe, Abb. 8.3 S. 137; (DMSe) Abb. 4.3A) S.83) oder werden noch an anderer Stelle diskutiert (TMBi, Abb. 8.8 S. 141). Der Vollständigkeit halber und als Nachweis für diese Spezies werden die Spektren aus dieser Studie aber im Anhang aufgeführt (s. Abb. 8.6 S. 139).

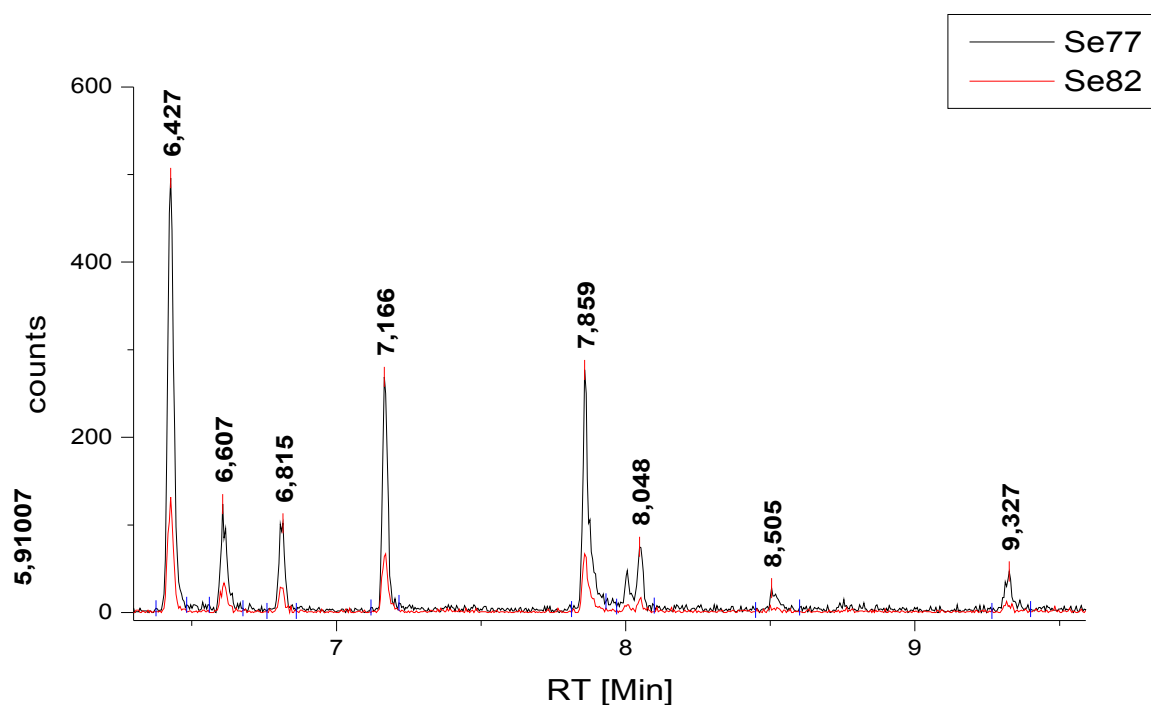
Bei übereinstimmenden Retentionszeiten im ICP-MS Chromatogramm wurden diese Spektren als indirekter Beleg für die Anwesenheit der jeweiligen Elementspezies gewertet, auch wenn in der entsprechenden Messung selbst die Signalintensität nicht ausreichend war um ein EI-Massenspektrum extrahieren zu können.

Die folgende Abbildung 4.5 zeigt das ICP-MS Chromatogramm der Selenisotope  $^{77}\text{Se}$  und  $^{82}\text{Se}$  aus der Messung des Gasraums von *Methanoplanus limicola*.

Bei diesem Organismus konnte anders als bei den übrigen Arten mit zehn unbekannten Selenspezies ein sehr breites Spektrum an gasförmigen Metall(oid)verbindungen beobachtet werden. Die Signalintensitäten für diese unbekannten Spezies waren jedoch zu gering, um EI-Massenspektren zu erhalten. Auch über den indirekten



Vergleich mit anderen Messungen war in diesen Fällen keine Identifikation möglich. Darüber hinaus konnten mit der ICP-MS drei Tellur- sowie zwei Arsenverbindungen nachgewiesen werden, deren genaue Struktur nicht geklärt werden konnte.



**Abbildung 4.5:** ICP-MS Chromatogramm für die Massenspuren  $m/z$  77 und 82 aus der Messung des Gasraums von *Methanoplanus limicola*

Eine Übersicht dieser Resultate wird in der nachfolgenden Tabelle 4.1 dargestellt. Da die hier vorgestellte Auswertung unter rein qualitativen Gesichtspunkten durchgeführt wurde, fanden Peakhöhen oder -flächen bei dieser Darstellung keine Beachtung. Dementsprechend sind dort auch die Ansätze mit verschiedenen Metall(oid)-konzentrationen zusammengefasst. Wurden bei Messungen des gleichen Organismus für dieselbe Verbindung abweichende Retentionszeiten ermittelt, fanden beide Zeiten Berücksichtigung.

Tabelle 4.1: Nachgewiesene Elementspezies und deren Retentionszeiten im ICP-MS nach Headspace Untersuchungen zur Volatilisierung von Metall(oid)en durch verschiedene methanogene Archaea mittels GC/EI-MS/ICP-MS Kopplung. Bibliotheksspektren (BS) s. Abb. 8.6 S. 139

	<i>Methanlobus tindarius</i>		<i>Methanosphaera stadtmanae</i>		<i>Methanococcus vannielii</i>		<i>Methanoplanus limicola</i>		<i>Methanobrevibacter smithii</i>	
	RT <sub>ICP</sub> [Min]	Beleg	RT <sub>ICP</sub> [Min]	Beleg	RT <sub>ICP</sub> [Min]	Beleg	RT <sub>ICP</sub> [Min]	Beleg	RT <sub>ICP</sub> [Min]	Beleg
<b>DMS<sub>e</sub></b>	6,450	indirekt über RT	6,423 und 6,426	MS mit BS	6,423	indirekt über RT	6,426	indirekt über RT	6,410	indirekt über RT
<b>Se-X(1)</b>	6,04	kein MS	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
<b>Se-X(2)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	6,610	kein MS	n.d.	n.d.
<b>Se-X(3)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	6,815	kein MS	n.d.	n.d.
<b>Se-X(4)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	7,167	kein MS	n.d.	n.d.
<b>Se-X(5)</b>	n.d.	-	7,858	kein MS	7,863	kein MS	7,858	kein MS	7,858	kein MS
<b>Se-X(6)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	8,007	kein MS	n.d.	-
<b>Se-X(7)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	8,048	kein MS	n.d.	-
<b>Se-X(8)</b>	n.d.	-	8,505	kein MS	n.d.	-	8,505	kein MS	8,505	kein MS
<b>Se-X(9)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	9,327	kein MS	n.d.	-
<b>Se-X(10)</b>	n.d.	-	n.d.	-	10,29	kein MS	n.d.	-	n.d.	-
<b>DMTe</b>	6,768 und 6,792	MS	6,768 und 6,778	indirekt über RT	6,768 und 6,773	MS	n.d.	-	6,765	indirekt über RT
<b>Te-X(1)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	7,383	kein MS	n.d.	-
<b>Te-X(2)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	7,858	kein MS	n.d.	-
<b>Te-X(3)</b>	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	8,847	kein MS	n.d.	-
<b>TMS<sub>b</sub></b>	6,612	MS mit BS	6,612 und 6,607	indirekt über RT	6,607 und 6,612	indirekt über RT	n.d.	-	6,62	indirekt über RT
<b>As-X(1)</b>	n.d.	-	n.d.	-	6,108	kein MS	n.d.	-	n.d.	-
<b>As-X(2)</b>	n.d.	-	n.d.	-	6,358	kein MS	n.d.	-	n.d.	-
<b>TMBi</b>	7,110 und 7,128	indirekt über RT	n.d.	-	7,115	MS mit BS	n.d.	-	n.d.	-

n.d.: nicht detektiert , kein MS: kein EI-Massenspektrum verfügbar

#### ♦ *Interpretation und Diskussion*

Die Hypothese, dass die mikrobielle Methylierung von Bismut durch *Methanobacterium formicicum* über teilmethylierte Zwischenstufen abläuft [Michalke et al. 2002], konnte mit Hilfe der Resultate aus Studie I gestützt und Trimethylbismut als Endprodukt dieses Prozesses verifiziert werden.

Weiterhin belegen die nachgewiesenen Ethylderivate, dass die Derivatisierung erfolgreich war und sich gut zur Volatilisierung von Methylbismutspezies eignet.

Da keine Standards für diese Verbindungen verfügbar waren, konnten keine Aussagen bezüglich der Effizienz dieser Reaktion getroffen werden. Entsprechende Studien sollten aber nachgeholt werden, sobald diese Standards zu erwerben sind.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur mikrobiellen Volatilisierung von Selen, Tellur, Arsen, Antimon, Bismut und Quecksilber durch verschiedene Archaea-Arten (Studie II) konnten den vorteilhaften Einsatz der ICP-MS als Multielementdetektor belegen.

Mit Hilfe der EI-MS war der eindeutige und direkte Nachweis der permethylierten Derivate der Elemente Selen, Tellur, Antimon und Bismut im Gasraum diverser Mikroorganismen möglich. In einigen Fällen, in denen die Empfindlichkeit des molekülspezifischen EI-MS Detektors zu gering war um Massenspektren für diese Verbindungen zu erhalten, erlaubte die hohe Präzision der Methode hinsichtlich ihrer chromatographischen Reproduzierbarkeit die indirekte Zuordnung der Peaks dank übereinstimmender Retentionszeiten in den ICP-MS Chromatogrammen (s. Tab. 4.1 S. 86). Für die unbekannten Spezies, für die weder die indirekte noch die direkte Strukturidentifizierung erfolgreich war, bleibt die begründete Hoffnung auf zukünftige Messungen, bei denen die entsprechenden Verbindungen in ausreichender Menge vorliegen.

Durch systematische Studien und eventuelle Steigerung der Stoffwechseleffizienz für den fraglichen Organismus bestünde die Möglichkeit, gezielt auf eine solche Identifikation hinzuarbeiten. Bei Verwendung der gleichen chromatographischen Parameter, was bei dieser Methode problemlos möglich ist, können dann über die Retentionszeiten die Verbindungen indirekt einer Struktur zugeordnet werden.

Ist die simultane Aufnahme eines EI-Massenspektrums möglich, stellt diese Option eine simple und zugleich sichere Technik zur direkten Identifizierung flüchtiger Metall(oid)e als Produkte des mikrobiellen Stoffwechsels in der Gasphase dar. Die Methode ist zudem unabhängig von Systemparametern oder von chromatographischen

Bedingungen, die die Vergleichbarkeit und Verlässlichkeit von Siedepunkt/Retentionszeit-Korrelationen und daraus resultierenden Rückschlüssen auf die Struktur der Verbindung stark einschränken. Darüber hinaus konnte anhand dieser Studien demonstriert werden, dass man mit der fragmentanalytischen Verifizierung in der Lage ist, der bei gasförmigen Spezies verstärkt auftretenden Problematik der mangelhaften Verfügbarkeit von Standards wirkungsvoll zu begegnen.

## **4.2 Untersuchungen zur Metabolisierung von Bismut im menschlichen Körper**

Aufbauend auf den Erfahrungen, die hinsichtlich der Analytik von Bismutspezies in mikrobiologischen Systemen gemacht worden waren (s. Kap. 4.1), sollte eine Anpassung der Methode durchgeführt werden, die ihren Einsatz für die Untersuchung humanbiologischer Probenmatrizes ermöglichte. Ziel war die Anwendung der simultanen EI-MS und ICP-MS Detektion in einer modellhaften Metabolismusstudie für ein Projekt aus der Toxikologie (Teilprojekt T3 der Forschergruppe).

Probandenstudien mit Applikation hochtoxischer Metalle wie Quecksilber sind aus ethischen Gründen nicht durchführbar. Die Untersuchung des Humanmetabolismus von Metall(oid)en unter kontrollierten Bedingungen erfordert daher die Verwendung von Modellsubstanzen, die in den gewählten Dosen zu keinen gesundheitlichen Störungen führen. Demzufolge sollten durch die Untersuchung von Blut, Urin, Stuhl und Atem auf Bismutverbindungen nach Ingestion eines bismuthaltigen Präparates (Bismut(III)citrat) Erkenntnisse über den Stoffwechsel dieses Elementes im menschlichen Körper gewonnen werden. Dieses Pharmazeutikum, das gegenwärtig noch in einigen Ländern der EU zur Therapie von Magen- und Duodenalulzera zugelassen ist, wurde als nicht-toxische Modellverbindung an Probanden verabreicht. In Deutschland sind keine Bismutpräparate mehr auf dem Markt, da für die genannten Indikationen wirksamere Medikamente verfügbar sind.

### **• Experimentelles**

Da das Blut als Haupttransportmedium im menschlichen Stoffwechsel fungiert, war die Wahrscheinlichkeit, den Umwandlungsprozess des Elements Bismut verfolgen zu können, in den entsprechenden Blutproben am höchsten. Allerdings stellte sowohl die Probenmatrix aufgrund der komplexen Zusammensetzung des menschlichen Blutes als auch die äußerst geringe Konzentration, die für die Stoffwechselprodukte zu erwarten war, eine große Herausforderung dar.

Denn um Umwandlungsprozesse auf derart niedrigem Niveau chronologisch verfolgen zu können, wie es im Rahmen dieser Probandenstudie geplant war, bestand die Notwendigkeit, eine gute Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Probenaufgabe zu etablieren. Als problematisch stellte sich diesbezüglich zum einen die geringe Stabilität der ethylierten Bismutspezies, zum anderen die starke Schaumbildung durch den

Purgegasfluss und die Reaktion der proteinhaltigen Blutmatrix mit dem Derivatisierungsmittel heraus.

Zur Bewältigung der Stabilitätsprobleme wurden 3mL Blut im Derivatisierungsgefäß vor Zugabe des Derivatisierungsmittels 2 Minuten mit Helium gespült, um bei der Abfüllung der Probe eingeschlossenen Sauerstoff zu entfernen. Weiterhin wurde auf die Anwendung von Magnesiumperchlorat als Trockenmittel verzichtet, da Vorversuche mit  $\text{Bi}^{3+}$  Standards gezeigt haben, dass bei Verwendung dieser Substanz kein Trimethylbismut detektiert werden konnte.

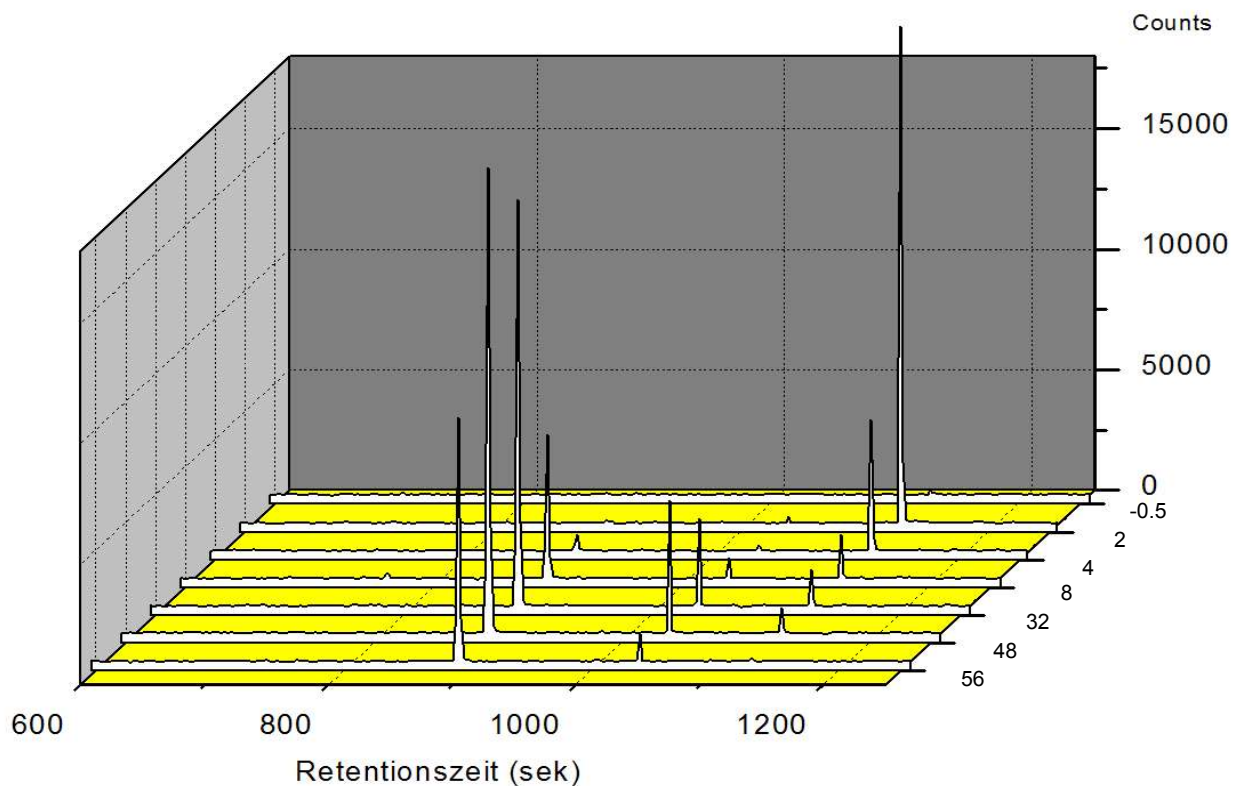
Um der Schaumbildung zu begegnen, wurden verschiedene Entschäumungsmittel getestet. Ein Entschäumer mit der Bezeichnung Antifoam 289 (Sigma, St. Louis, USA) stellte sich als ungeeignet heraus, da er Verunreinigungen von Bismut enthielt. Reines Silikonöl war wenig effektiv und unterdrückte in der zur Entschäumung notwendigen Menge die Ethylierungsreaktion. Als effektiver Entschäumer ohne störende Verunreinigungen wurde schließlich das Produkt Antifoam 204 (Sigma, St. Louis, USA) auf Basis von organischen und silikonhaltigen Inhaltsstoffen ausgewählt und angewendet. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  der NaTeEB-Lösung (1%, GALAB, Geesthacht, Deutschland), wurden zwischen 30 und 90  $\mu\text{L}$  des 1:100 verdünnten Entschäumers über eine Spritze in 10  $\mu\text{L}$  Einheiten zudosiert. Nach einer Minute Reaktionszeit fand die weitere Probenaufgabe statt, wie in Kapitel 3.3.2 (Seite 64 ff.) beschrieben. Die Purgezeit für die Trapvorgänge betrug jeweils 5 Minuten, die in den Retentionszeiten entsprechend enthalten sind. Alle weiteren Parameter hinsichtlich Chromatographie- und Detektionsbedingungen entsprechen den in Tabelle 3.10 (S. 71) und Tabelle 3.4 (S. 54) aufgelisteten Daten. Zur Aufnahme der ICP Chromatogramme wurde die Masse 209 betrachtet.

#### ♦ *Ergebnisse*

Dank der hohen Empfindlichkeit des ICP-MS Detektors war es möglich, die zeitlich versetzte Zu- und Abnahme von drei Bismutspezies abhängig vom Zeitpunkt der Einnahme des Präparates in den entsprechenden Chromatogrammen zu verfolgen. Die variierenden Speziesverteilungen in den Blutproben, die eine halbe Stunde vor sowie nach 2, 4, 8, 32, 48 und 56 Stunden genommen wurden, veranschaulicht Abbildung 4.6 anhand der Bi-Signals der ICP-MS Messungen.

In der Probe, die acht Stunden nach der Ingestion genommen wurde, konnte zusätzlich

eine vierte Spezies detektiert werden.



**Abbildung 4.6:**  $^{209}\text{Bi}$  Signale (ICP-MS Detektion) nach Etylierung und P & T Aufgabe der Blutproben eines Probanden von unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Einnahme von Bismut(III)citrat

Obwohl die Empfindlichkeit des EI-MS nicht ausreichend war um Massenspektren für diese unbekannten Bismutverbindungen zu extrahieren, war dennoch eine Identifizierung möglich, da die Retentionszeiten mit den Verbindungen TMBi, MEDMBi, DEMMBi und TEBi, die bei den mikrobiologischen *in vitro* Untersuchungen identifiziert worden waren, übereinstimmten.

Der Nachweis von TMBi in der Blutprobe, die nach 8 Stunden genommen wurde, korrespondiert mit der maximalen Konzentration dieser Spezies in den Atemproben dieses Probanden, die ebenfalls 8 Stunden nach Einnahme des Bismutcitrats mit einer direkten GC-ICP-MS Kopplung [pers. Mitteilung R.A. Diaz-Bone] festgestellt wurde. Tabelle 4.2 gibt die Resultate der Speziesuntersuchungen an den Blutproben wieder. Die Probenmengen waren mit Ausnahme der Proben nach 2 und nach 56 Stunden ausreichend für eine Doppelbestimmung. Ergänzend sind die Ergebnisse der Bestimmung des Gesamtbismutgehalts im Blut aufgeführt, der im Rahmen der Gesamtstudie routinemäßig durch ICP-MS Messungen nach Mikrowellen-

Druckaufschluss erfasst wurde.

*Tabelle 4.2: Peakflächen der nach Ethylierung und P & T Aufgabe in den Blutproben vor und nach der Einnahme von Bismut(III)citrat detektierten Bismutspezies und Gesamtgehalt an Bismut.*

Zeit vor/nach Ingestion [h]	Area (TMBi)	Area (MEDMBi)	Area (DEMMBi)	Area (TEBi)	Bi <sub>ges</sub> [µg/kg]
- 0.5 (Tag 0, 08:30a)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<
- 0.5 (Tag 0, 08:30b)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 (Tag 0, 11:00)	n.d.	n.d.			10,4
			6,17E+02	4,63E+04	
4 (Tag 0, 13:00a)	n.d.	1,89E+03	5,58E+02	1,11E+04	5,34
4 (Tag 0, 13:00b)	n.d.	1,93E+03	4,49E+02	1,14E+04	
8 (Tag 0, 17:00a)	8,99E+02	1,80E+04	1,96E+03	3,88E+03	2,77
8 (Tag 0, 17:00b)	9,26E+02	2,36E+04	4,55E+03	1,73E+04	
32 (Tag1, 17:00a)	n.d.	5,03E+04	7,63E+03	3,77E+03	1,29
32 (Tag1, 17:00b)	n.d.	4,84E+04	1,30E+04	1,55E+04	
48 (Tag 2, 09:00a)	n.d.	5,63E+04	1,54E+04	3,35E+04	1,27
48 (Tag 2, 09:00a)	n.d.	5,74E+04	1,06E+04	2,73E+03	
56 (Tag 2, 17:00)	n.d.	2,94E+04	2,50E+03	n.d.	1,25

n.d. : nicht detektiert

Die Daten belegen durch den Vergleich der Doppelbestimmungen, dass die Bestimmung des Trimethylbismuts sowie die Ethylierung der teilmethylierten Bismutverbindungen und deren anschließende Detektion insgesamt zufriedenstellend reproduzierbar waren. Für das als TEBi erfasste Bi<sup>3+</sup> trifft dieses allerdings nur bedingt zu. Die in Abbildung 4.6 durch die ausgewählten Messungen implizierte Abnahme dieser Verbindung wird jedoch qualitativ durch die Ergebnisse der Bismut Gesamtgehaltbestimmungen bestätigt. Vor der Einnahme des Bismutpräparates konnten keine Spezies detektiert werden.

#### • Interpretation und Diskussion

Durch den Vergleich der Messungen vor und nach der Einnahme konnte eindeutig eine Antwort des menschlichen Stoffwechsels auf eine Exposition durch das Element Bismut gezeigt werden. Mit Hilfe der routinemäßigen Anwendung der simultanen EI-MS und ICP-MS Detektion konnte der indirekte Beweis erbracht werden, dass es sich bei den



detektierten Spezies um Methylderivate des Bismuts handelt. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die Metabolisierung dieses Metalls in Form einer Methylierung stattgefunden hat. Die Ergebnisse lassen keinen konkreten Schluss zu, wo diese Spezies entstanden sind, allerdings ist die Darmflora der wahrscheinlichste Ort für diese Umsetzung. Die Ausscheidung findet zumindest teilweise durch Exhalation des permethylierten TMBi über die Lungen statt, wie die korrespondierenden Ergebnisse der Untersuchung der Atemproben zeigten.

Betrachtet man die Reproduzierbarkeit der Methode anhand der Doppelbestimmungen, ist ein Trend abnehmender Präzision mit steigendem Methylierungsgrad der Verbindungen zu erkennen. Dieses könnte auf reaktionskinetische Ursachen zurückzuführen sein, da die Wahrscheinlichkeit für die Anlagerung an das Bi-Ion mit steigender Anzahl der benötigten Ethylgruppen abnimmt und die Bildung des Moleküls aufgrund der geringeren Reaktionsgeschwindigkeit stärker durch die schlecht reproduzierbaren Interferenzreaktionen mit der komplexen Matrix beeinträchtigt wird. Ebenso könnte eine geringere Stabilität mit zunehmendem Ethylierungsgrad die Ursache für die etwas geringere Präzision der Methode bei der Detektion des DEMMBi und die mangelhafte Reproduzierbarkeit für das TEBi sein. Entsprechende Studien zur Überprüfung dieser Vermutungen sollten mit Hilfe von Standards durchgeführt werden, sobald diese verfügbar sind. Die für die Stoffwechseluntersuchungen interessanten Methylspezies konnten aber zufriedenstellend detektiert werden. Hervorzuheben ist dabei das einfache Probenaufgabeprinzip, welches durch direkte Ethylierung in der bisher hinsichtlich Speziesanalytik noch sehr wenig untersuchten Matrix Humanblut und anschließender gas/flüssig Separation *via* Purge & Trap eine reproduzierbare und damit präzise Analytik ermöglichte. Auf eine Probenaufbereitung konnte dadurch vollkommen verzichtet und die Gefahr der nachträglichen Veränderung der Probe minimiert werden. Da darüber hinaus die Ergebnisse trotz zufälliger Messreihenfolge in ihrer chronologischen Abfolge eine zeitaufgelöste Zu- und Abnahme der Analyten widerspiegeln, kann davon ausgegangen werden, dass sie die im Körper zu den jeweiligen Probennahmezeitpunkten vorliegende Speziesverteilung nahezu unverändert abbilden.

Damit bietet die vorgestellte Methode für die speziesbezogene Untersuchung des Elements Bismut und dessen Verhalten im menschlichen Körper die Möglichkeit, strukturanalytisch abgesicherte Ergebnisse zu liefern, ohne dabei auf die Präzision und Empfindlichkeit elementspezifischer Detektion verzichten zu müssen. Eine Übertragung

der Methode auf weitere ethylierbare Elemente wie Blei, Zinn und Quecksilber ist problemlos möglich und bei Verfügbarkeit von Standards lassen sich quantitativ validierbare Resultate erzielen. In Kapitel 4.3 konnte dieses am Beispiel von Methylquecksilber belegt werden.

### ***4.3 Quantitativ und qualitativ validierte Quecksilberspezierung in Humanblut***

Durch das Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin des Universitätsklinikums Essen, mit dem im Rahmen der Metabolismusstudie (s. Kap. 4.2) bereits eine weitere Kooperation innerhalb des Forschergruppen-Projekts T3 bestand, war mit der Betriebsleitung und den Beschäftigten eines Quecksilber-Recyclingbetriebs eine umfassende Belastungskontrolle vereinbart worden.

In dieser Studie sollten Atemluft-, Blut-, Urin- und Stuhlproben hinsichtlich der Fragestellung nach einer mikrobiell induzierten Methylierung im menschlichen Organismus untersucht werden. In den gesammelten Proben sollten daher sowohl die Quecksilbergesamtgehalte als auch die stark neuro- und embryotoxischen Methylderivate bestimmt werden.

Aufgrund der nicht unerheblichen Quecksilberexposition, der Arbeiter in Hg-Recyclingbetrieben ausgesetzt sind, hatte diese Frage aus arbeitsmedizinischen Gesichtspunkten einen erhöhten Klärungsbedarf.

Nachdem die direkte Ethylierung in der Matrix, wie sie für die methylierten Bismutspezies angewendet werden konnte (s. Kap. 4.2 S. 89), für Quecksilber nicht erfolgreich war, musste eine effiziente Methodik zur Extraktion von Methylquecksilberspezies aus Humanblut gefunden werden. Zur quantitativen Qualitätssicherung wurde eine Vergleichsmessung der Blutproben von einem Referenzlabor durchgeführt.

In Ergänzung dazu sollte die simultane GC/EI-MS/ICP-MS Kopplung zur Absicherung der strukturellen Identität der Analyten verwendet werden und somit verhindern, dass eine eventuelle Artefaktbildung unbemerkt bleibt. Hierzu wurden zum Vergleich die Ergebnisse betrachtet, die nach Ethylierung eines Methylquecksilberchloridstandards erhalten wurden.

#### **♦ Experimentelles**

##### **• Extraktion und Analyse von Methylquecksilber in Humanblut**

Der Aufschluss beruht auf der leicht sauren Zersetzung der Matrix (2 mL Blut) mit Hilfe einer KBr/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Mischung (2mL, 1,5 molar, Merck, Darmstadt / 2 molar, Merck,

Darmstadt). Danach wurde die Extraktion mit 5 mL tert.-Butylmethylether (MTBE, Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Die organische Phase konnte nach Zentrifugation über 6 Minuten bei 4000 U/Min abgenommen werden. Abschließend erfolgte eine Rückextraktion in die wässrige Phase bei 70°C.

Durch Zugabe von 3 mL Citratpuffer wurde ein pH-Wert von 5 eingestellt, bei dem die Analyten durch Ethylierung mit 100 µL NaTeEB-Lösung (1%, GALAB, Geesthacht, Deutschland) erfolgreich derivatisiert werden konnten.

Die Probenaufgabe erfolgte mit der bekannten Purge & Trap Technik (s. Kap. 3.3.2, S. 64) unter den bereits beschriebenen Bedingungen (s. Tab. 3.10 S. 71). Dort sind auch die chromatographischen Parameter aufgeführt, die sich nur durch ein leicht verändertes Temperaturprogramm für den Ofen unterscheiden.

Bei den Detektionsbedingungen (s. Tabelle 3.4 S. 54) wurde lediglich das Massenfenster des EI-MS auf  $m/z$  195 bis  $m/z$  350 verringert, da Fragmente mit geringeren Massen zur Identifikation der Methylquecksilberspezies nicht erforderlich waren, und so eine erhöhte Empfindlichkeit dieses Detektors erreicht werden konnte. Im ICP-MS wurde auf der Masse 202 das entsprechende Isotop des Quecksilbers detektiert.

Zur Quantifizierung des Monomethylquecksilberions ( $\text{MMHg}^+$ ) als Ethylmethylquecksilber ( $\text{EMHg}$ ) wurde unter Verwendung der gleichen Probenaufgabetechnik nach Ethylierung eine externe Kalibration mit Monomethylquecksilberchlorid (Strem, Kehl) in wässriger Lösung durchgeführt. [pers. Mitteilung, J. Hippler]

Das Referenzlabor verwendete eine Methode aus der MAK Sammlung der DFG zur Analyse von Methylquecksilber in Humanblut [Hoppe 2006]

♦ *Ergebnisse*

• *Resultate der Vergleichsmessung zur quantitativen Validierung*

In den Blutproben wurden von beiden Laboren in guter Übereinstimmung geringe Mengen von Methylquecksilber zwischen 0,30 und 4,4 µg/L gefunden. Tabelle 4.3 zeigt diese Daten für die einzelnen Probanden.

*Tabelle 4.3: Ergebnisse der Vergleichsuntersuchung von Blutproben der Mitarbeiter eines Hg-Recyclingbetriebs auf Methylquecksilber [pers. Komm. J. Hippler]*

<b>Proband</b>	<b>Nr.</b>	<b>diese Studie MMHg [µg/L]</b>	<b>Referenzlabor MMHg [µg/L]</b>
?E.	19	1,23	1,14
A.E.	17	1,29	1,12
A.K.	10	0,47	0,72
B.J.	14	0,31	0,37
B.K.	7	0,56	0,55
G.G.	15	1,49	1,32
H.B.	21	1,14	0,96
H.K.	3	1,82	1,78
J.P.	16	4,40	3,32
M.K.	20	0,87	0,66
O.Y.	5	0,99	0,90
PC. D.	13	3,64	2,86
R.G.	9	1,30	0,97
R.H.	1	0,52	0,30 <sup>a</sup>
R.K.	23	0,69	0,46
R.KI.	2	3,61	3,57
R.Kle.	22	0,33	0,30 <sup>a</sup>
R.Kö.	18	2,36	2,65
R.M.	6	0,93	0,81
S.V.	BB	0,94	0,89
U.G.	ZZ	0,64	0,56
Y.Z.	12	1,06	keine Daten

<sup>a</sup> < NWG = 0,3 [µg/L]

- Verifizierung der Peaks zur qualitativen Absicherung

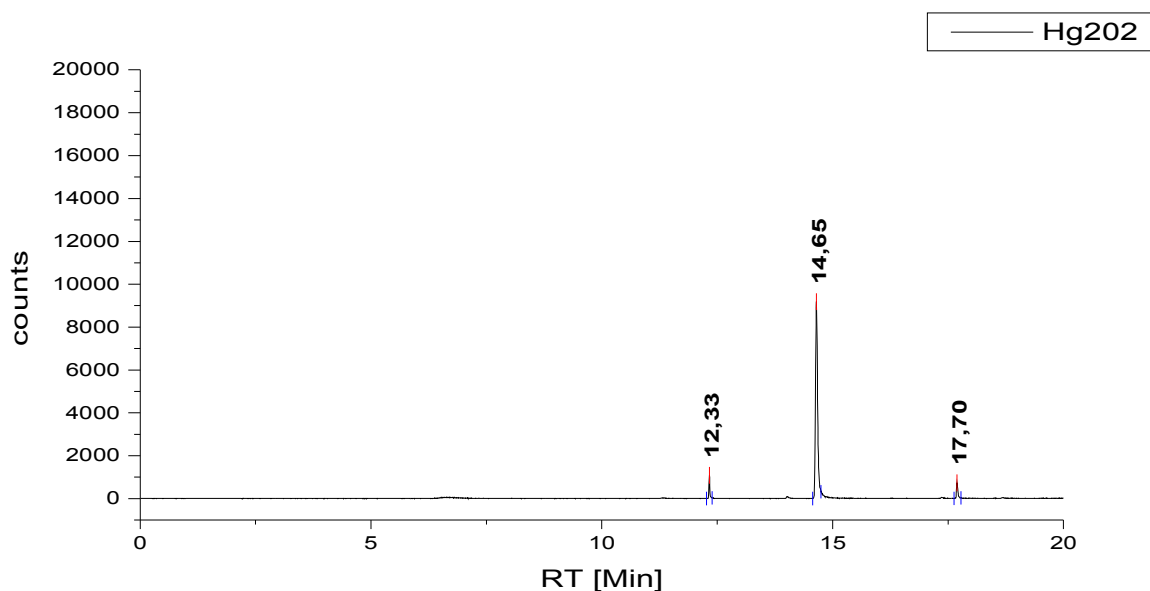


Abbildung 4.7: ICP-MS Chromatogramm von  $^{202}\text{Hg}$  nach Ethylierung der Probe J.P. 15 mit Ausschnittsvergrößerung

Wie am Beispiel des ICP-MS Chromatogramms der Masse 202 (Abb. 4.7), das nach Ethylierung der Probe J.P. 15 aufgenommen wurde, zu sehen ist, konnten über diesen Detektor neben einem Hauptpeak zwei weitere kleine Peaks nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Massenspektrums aus der EI-MS Detektion (Abb. 4.8) konnte der höchste Peak bei 14,65 Min (14,61 im EI-MS) mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ethylmethylquecksilber identifiziert werden. Bei den zwei weiteren Peaks konnten keine Massenspektren isoliert werden, da die Konzentration zu gering war.

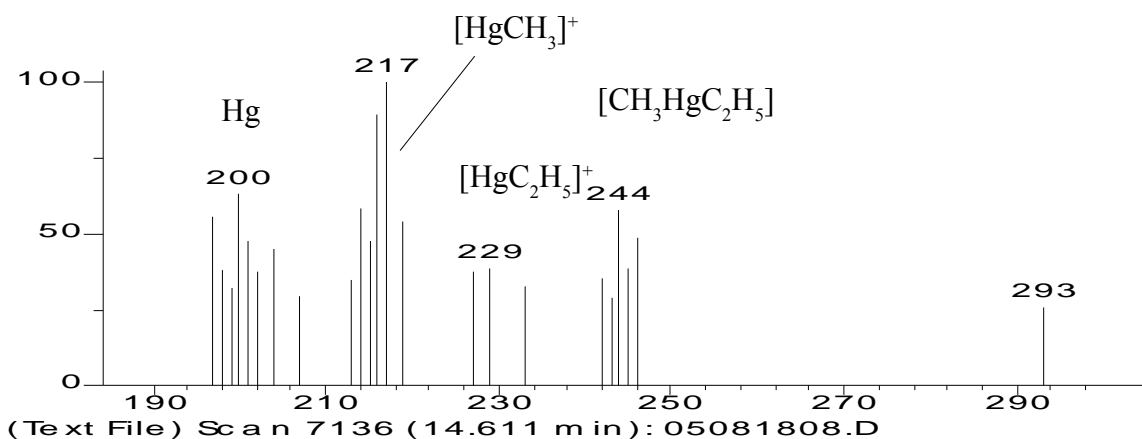
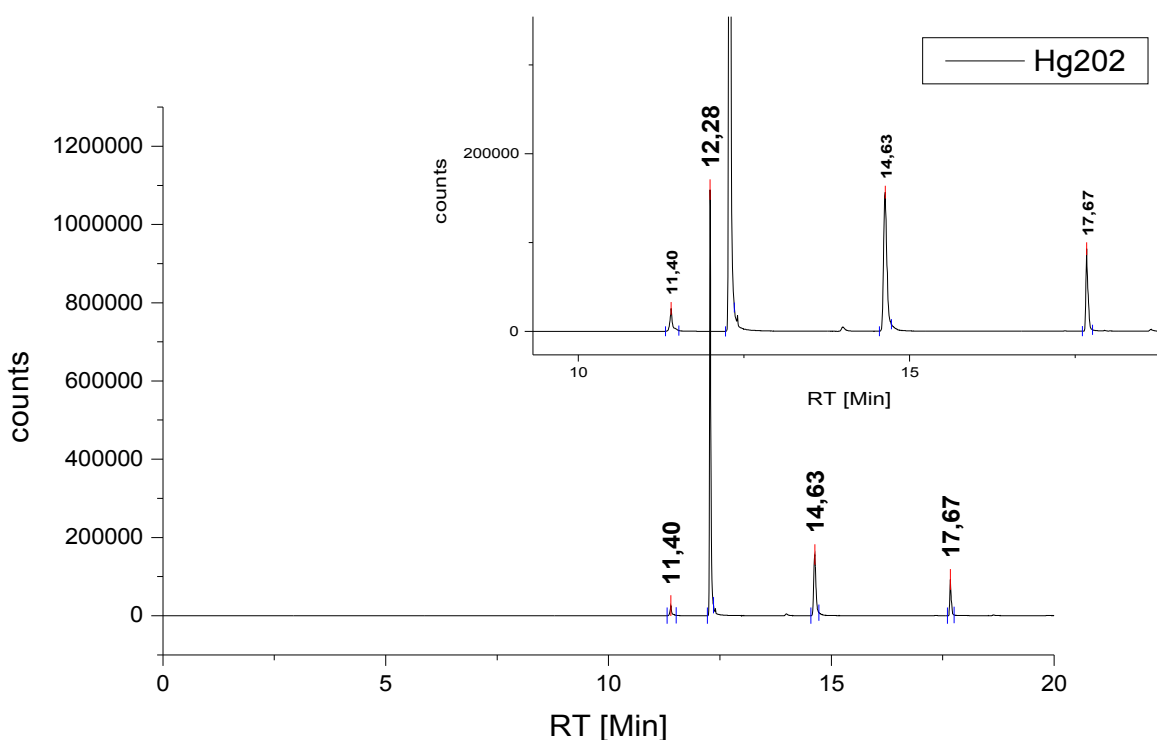


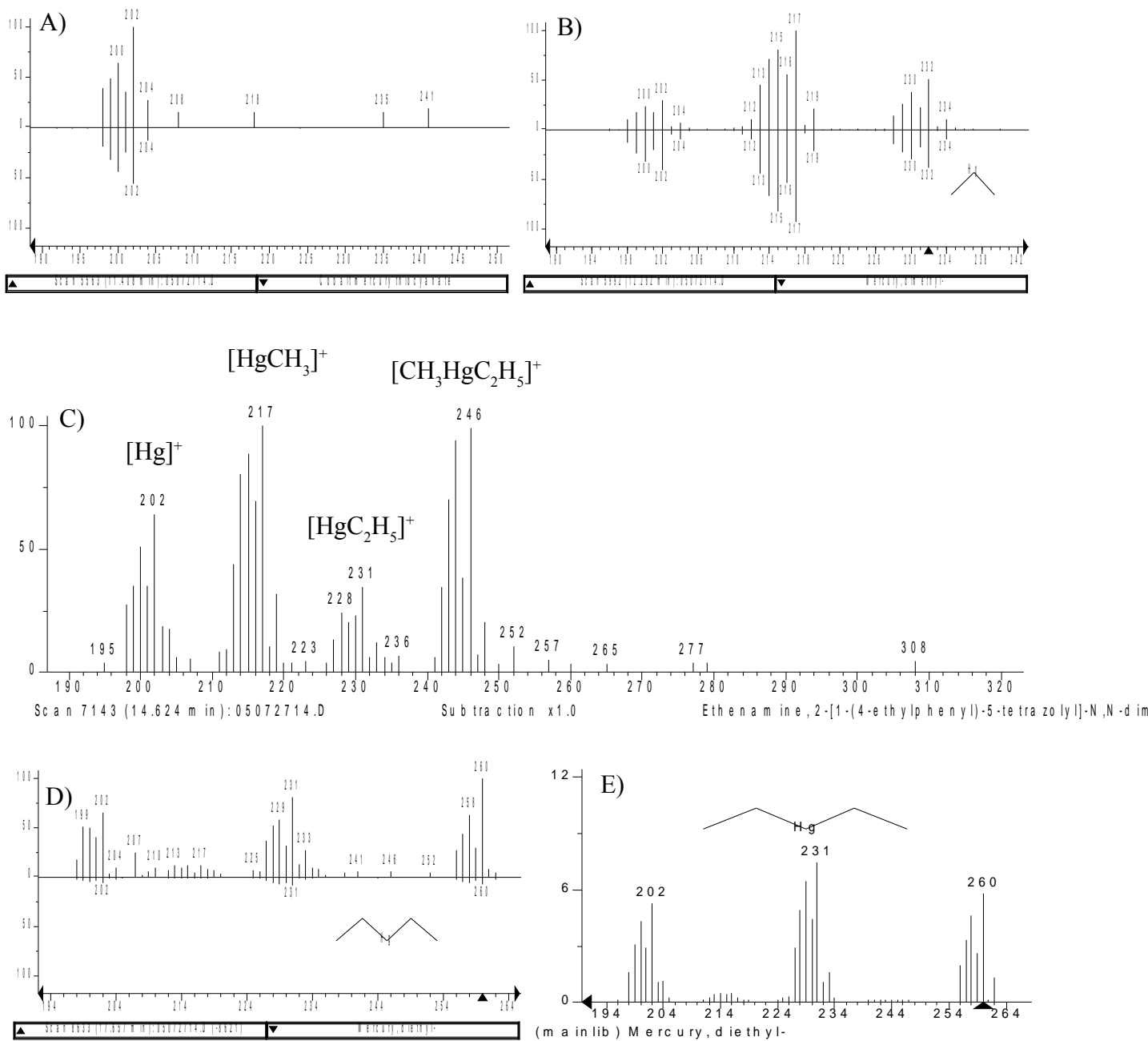
Abbildung 4.8: Massenspektrum aus dem EI-MS Chromatogramm der Probe J.P. 15 bei 14,6 Min

Um die Vermutung bezüglich der Hauptspezies zu verifizieren, wurden die chromatographischen und massenspektrometrischen Daten, die nach Ethylierung einer hochkonzentrierten Standardlösung (50 ng Methylquecksilberchlorid) mit der gleichen Methode aufgenommen wurden, zum Vergleich herangezogen. Abbildung 4.9 zeigt das ICP-MS Chromatogramm dieser Messung. Hier sind mit einer leichten Verschiebung der Retentionszeiten von ein bis zwei Sekunden die gleichen Peaks, wie in der Probe J.P. 15 (s. Abb. 4.7 S.98) zu erkennen. Zusätzlich ist ein weiterer Peak (RT 11,40 Min) zu beobachten.



**Abbildung 4.9: ICP-MS Chromatogramm von  $^{202}\text{Hg}$  nach Ethylierung einer Standardlösung (50 ng MMHgCl absolut) mit Ausschnittsvergrößerung**

Sämtliche Peaks die nach Ethylierung des Methylquecksilberchloridstandards beobachtet wurden, konnten anhand der Massenfragmentinformationen, die zu den jeweiligen Retentionszeiten über die EI-MS ermittelt wurden (s. Abb 4.10), identifiziert, und wie in Tabelle 4.4 dargestellt, elementarem Quecksilber sowie den Verbindungen Dimethylquecksilber (DMHg), Ethylmethylquecksilber (EMHg), und Diethylquecksilber (DEHg) zugeordnet werden.



**Abbildung 4.10:** EI-Massenspektren nach Ethylierung von 50 ng Methylquecksilberchlorid bei A) RT 11,41 Min (oben), Isotopenmuster von  $\text{Hg}^0$  von einer in der Bibliothek befindlichen Quecksilberverbindung (Cobalt Quecksilberthiocyanat, unten) B) RT 12,28 Min (oben), Bibliotheksspektrum von Dimethylquecksilber (unten) C) RT 14,62 Min D) RT 17,66 Min (oben), Bibliotheksspektrum von Diethylquecksilber (unten) E) Vergrößerung des Bibliotheksspektrum von Diethylquecksilber.



Tabelle 4.4: Zuordnung der Peaks, die nach Ethylierung der Standardlösung (s. Abb. 4.9) beobachtet wurden

RT <sub>EI-MS</sub> [Min]	RT <sub>ICP-MS</sub> [Min]	Verbindung	Beleg
11,41	11,40	Hg <sup>0</sup>	Isotopenmuster
12,28	12,28	DMHg <sup>a)</sup>	Bibliotheksspektrum
14,62	14,63	EMMe	Zuordnung der Fragmentmassen
17,66	17,67	DEHg	Bibliotheksspektrum

<sup>a)</sup> Verunreinigung vom vorangegangenen Versuch (s. Diskussion S. 101)

#### ◆ Diskussion

In Abbildung 4.11 wurden die Daten aus der Vergleichsmessung (Tab. 4.3 S. 97) nochmals veranschaulicht. Hieraus wird ersichtlich, dass die GC/EI-MS/ICP-MS Kopplung auch nach Extraktion und Ethylierung in der Lage war, quantitativ verlässliche Daten zu liefern, welche durch unabhängige Messungen mit der hoch präzisen ID-GC/ICP-MS Technik durch ein zweites Labor bestätigt werden konnten.

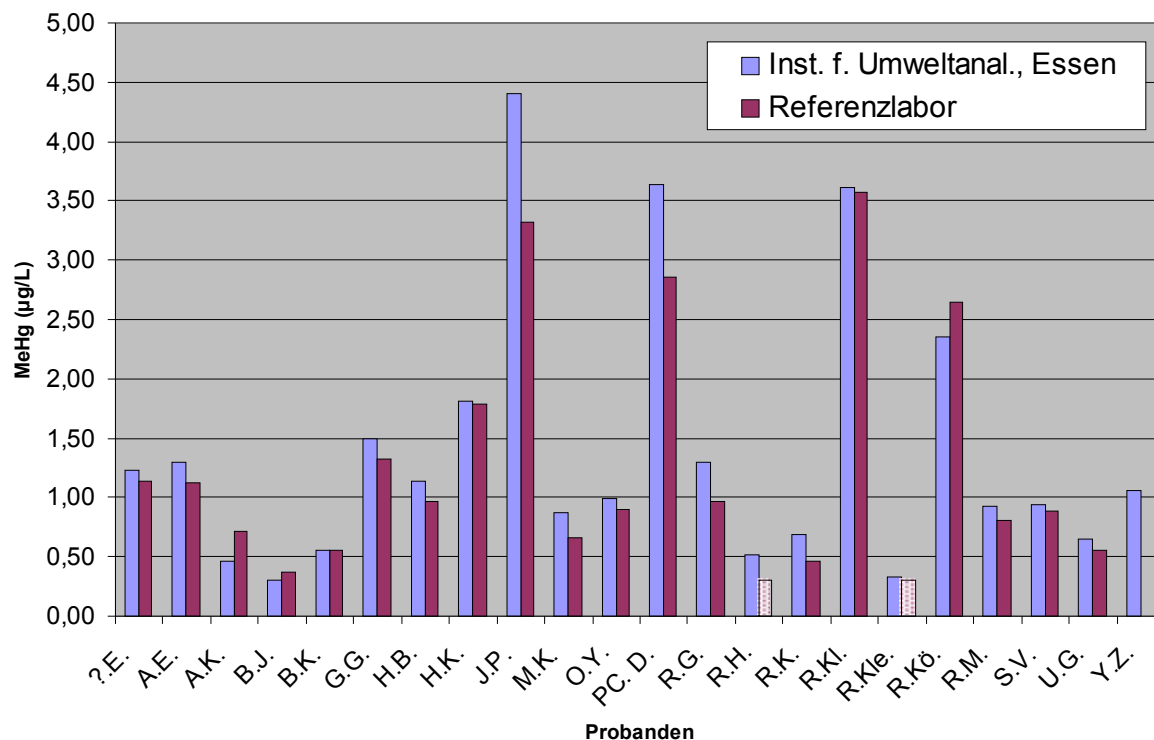


Abbildung 4.11: Laborvergleich zur quantitativen Validierung der Ergebnisse der Untersuchung von Humanblut auf Monomethylethylquecksilber

Hinsichtlich der qualitativen Validierung ist zunächst darauf hinzuweisen, dass das Massenspektrum, welches direkt bei der Messung der Probe ermittelt wurde, aufgrund der geringen Konzentration von relativ geringer Qualität ist und daher nur eine eingeschränkte Beweiskraft besitzt.

Allerdings liefern die vorhandenen Fragmentationen einen deutlichen Hinweis darauf, dass es sich im Fall der Komponente mit der Retentionszeit von 14,65 Min um das Ethylmethylquecksilber handelt, das als Produkt der Etyhlierung einer entsprechenden Methylverbindung zu erwarten war. In Kombination mit den strukturanalytischen und chromatographischen Daten, die mit Hilfe von EI-MS und ICP-MS für den konzentrierten Methylquecksilberchloridstandard ermittelt worden sind, konnte diese Vermutung überzeugend verifiziert werden, da das entsprechende Fragmentogramm eindeutig dem Ethylmethylquecksilber zuzuordnen war (Abb. 4.10 C) S. 100) und die Retentionszeit mit 14,63 Min (s. Abb. 4.9 S. 99) sehr gut mit dem für die Probe ermittelten Wert übereinstimmte.

Im ICP-MS Chromatogramm des ethylierten Standards waren drei weitere Quecksilberspezies zu erkennen, deren Retentionszeiten in zwei Fällen (12,28 und 17,67 Min) denen der Nebenkompontenten aus der Probe entsprachen. Mit Hilfe der EI-Massenspektren konnten diese Peaks in eindeutiger Übereinstimmung mit den jeweiligen Bibliotheksspektren den Verbindungen Dimethylquecksilber (s. Abb. 4.10 B) S. 100) und Diethylquecksilber (s. Abb. 4.10 D) u. E) S. 100) zugeordnet werden.

Der verbliebene erste Peak (RT 11,40 Min) konnte anhand des Isotopenmusters als elementares Quecksilber ( $\text{Hg}^0$ ) identifiziert werden, (s. Abb. 4.10 A) S. 100).

Dank dieser zusätzlichen Strukturinformationen ist eine relativ gesicherte Interpretation der vorliegenden Daten wie folgt möglich:

Sowohl in den Proben als auch in der untersuchten Standardlösung des Monomethylquecksilberchlorids findet offensichtlich eine intermolekulare Transmethylierung des Monomethylquecksilbers zu Dimethylquecksilber und  $\text{Hg}^{2+}$ , welches als Diethylquecksilber detektiert wurde, statt. Da Dimethylquecksilber aufgrund seiner Flüchtigkeit während des Extraktionsprozesses aus der Probe entwichen wäre, ist davon auszugehen, dass diese Reaktionsprodukte als Artefakte bei der Derivatisierung oder der damit verbunden Probenbehandlung entstanden sind.

Der Umfang dieser Reaktion ist jedoch vermutlich als gering anzusehen, wenn man die Verhältnisse der Peakhöhen im Chromatogramm der Probe (s. Abb.4.7 S. 98) in Betracht zieht. Die Höhe des Dimethylquecksilberpeaks im Chromatogramm des

ethylierten Standards lässt sich dabei mit der Kontamination des Systems erklären, die aus einem vorangegangenen Purgeversuche mit eben dieser Verbindung stammt.

Der Diethylquecksilberpeak in diesem Chromatogramm ist vermutlich aufgrund von Verunreinigungen des Monomethylquecksilberchlorids mit  $\text{HgCl}_2$  ebenfalls höher, als dieses der Fall wäre, wenn  $\text{Hg}^{2+}$  allein durch Transmethylierung entstanden wäre.

Ohne den routinemäßigen Einsatz der EI-MS als speziespezifischem Detektor wäre die Klärung dieses Artefaktproblems nur mit Hilfe zusätzlicher Einzelmessungen hochtoxischer Diethyl- und Dimethylquecksilberstandards möglich gewesen.

Auch bei zusätzlichen Komplikationen durch Kontamination des analytischen Systems oder durch Verunreinigungen der Standards aufgrund der mangelnden Stabilität dieser Verbindungen, konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche strukturanalytische Information dieses Detektors mehr als hilfreich, ist Fehlinterpretationen zu vermeiden und die Identität der Analyten zu bestätigen.

#### ***4.4 Überprüfung und Verifizierung von Derivatisierungsprodukten nach Hydridgenerierung***

Die Derivatisierung ionischer, nicht flüchtiger Verbindungen hydrierbarer Elemente mit Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) zur Volatilisierung dieser Spezies wird in der Literatur häufig beschrieben, jedoch ob der inhärenten Gefahr der Artefaktbildung ebenso oft kritisiert (s. Kap. 2.3 S. 32). Da diese Reaktion aber in ihrer Effizienz und Ihrem Anwendungsspektrum für Metall(oid)e wie Arsen, Antimon, Germanium, Selen und Tellur alternativlos ist, stellt sie nicht selten die einzige praktikable Möglichkeit dar, die Spezies dieser Elemente der Gaschromatographie zugänglich zu machen.

Die Vorteile einer gaschromatographischen Separation und der dadurch möglichen Purge & Trap-Aufgabe wurden ebenfalls im theoretischen Teil ausgeführt (s. Kap. 2.3 S. 32)

Nichtsdestotrotz ist es besonders bei Anwendung der Hydridgenerierung unabdingbar, die Identität erwarteter Spezies strukturanalytisch belegen zu können und unbekannte Peaks zu identifizieren, um eventuelle Artefaktbildungen erkennen und erklären zu können.

Am Beispiel einer Bodenprobe aus einem ehemals militärisch genutzten Areal sollte die Anwendbarkeit der Methode für die strukturanalytische Überprüfung von hydrierten Arsen- und Antimonspezies getestet werden. (Studie I)

Zur Strukturaufklärung in der Flüssigchromatographie steht mit der Elektrospray Ionisierung (ESI)- MS prinzipiell ein der EI-MS analoges strukturanalytisches Verfahren zur Verfügung. Allerdings bestehen bei dieser Technik noch stärkere Einschränkungen bezüglich der Empfindlichkeit als dieses für die EI-MS Detektion (im scan Modus) der Fall ist, sodass sie häufig für strukturanalytische Fragestellungen in der Elementspeziation nicht einsetzbar ist.

Da in der HPLC Analytik zudem die Reproduktion von Retentionszeiten schwieriger ist als in der Gaschromatographie und es aufgrund der geringeren Auflösung zu Koelutionen kommen kann, ist die Verifizierung der eluierten Verbindungen ein Problem, selbst wenn Standards vorhanden sind [Feldmann 2005].

Es sollte daher geklärt werden, inwieweit die GC/EI-MS/ICP-MS Kopplung dazu beitragen kann, im Falle hydrierbarer oder anderweitig volatilisierbare Verbindungen die fragliche Struktur aufzuklären.

Zu diesem Zweck wurde ein über einen Standard ( $\text{MMAsI}_2$ ) als monomethylarsonige

Säure (MMAs(OH)<sub>2</sub>, MMAs(III)) identifizierter Peak aus dem HPLC Lauf einer Urinprobe ausgeschnitten, die erhaltene Flüssigkeit hydriert und unter Verwendung des GC als einer zweiten chromatographischen Dimension mit der parallelen EI-MS und ICP-MS Detektion analysiert (Studie II).

Hintergrund dieser Untersuchung ist die Fragestellung, ob die Metabolisierung des Arsen(V) im menschlichen Organismus mit der Reduktion zu einer dreiwertigen Zwischenstufe einhergeht und die damit verbundene Forderung nach Verifizierung oder Falsifizierung einer dreiwertigen Monomethylarsenverbindung im menschlichen Urin.

Dieser Zusammenhang wurde in Kapitel 2.1.3 (S. 7) näher erläutert.

#### ♦ *Experimentelles*

##### *Studie I:*

Durch Hydrierung der wässrigen Probensuspension mit NaBH<sub>4</sub> wurden die Analyten derivatisiert und mit einem Heliumstrom auf einer U-Rohr Kühlfalle (s. Kap. 3.3.2 S. 66) in flüssigem Stickstoff einkondensiert. Einzelheiten zur Probennahme und Beschaffenheit des Bodens sowie zu den Bedingungen der Hydridgenerierung wurden an anderer Stelle beschrieben [Düster et al. 2005].

Die Kühlfalle wurde mit einer Ventilstellung entsprechend Abbildung 3.7 D) (S. 68) in das Aufgabesystem eingebaut und der Widerstandsdraht an einen Trafo angeschlossen. Da der erste Purge & Trap Schritt entfällt, verkürzt sich das chromatographische Programm um 5 Minuten.

Die Refokussierung auf dem PTV Injektor wurde, wie bereits in Kapitel 4.1 (S. 80) beschrieben, durchgeführt. Für die anschließende Probenaufgabe durch die Thermodesorption im PTV blieben die Parameter unverändert (s. Tab. 3.10 S.71).

Das für die EI-MS Detektion verwendete Massenfenster lag zwischen m/z 30 und m/z 350. Für die Detektion der Elemente Arsen und Antimon im ICP-MS wurden die Massen 75 und 121 gewählt.

*Studie II*

Von einer Urinprobe, in der die fragliche Arsenspezies enthalten war, wurden 20 µL auf das HPLC System (HPLC 1100, Agilent Technologies) gegeben. Tabelle 4.5 gibt die dabei verwendeten chromatographischen Parameter an. Über ein Schaltventil wurde unter Berücksichtigung der Zeit, die für den Flüssigkeitstransport vom Ventil zum Detektor (ICP-MS, 7500a, Agilent Technologies) benötigt wurde, das Eluat ab ca. einer Sekunde vor Peakbeginn und einer Sekunde nach Peakende in ein 20 mL Headspace Gefäß umgeleitet.

Auf dieselbe Weise wurde der MMAs(III) Peak aus einem HPLC-Lauf eines Multi-Spezies Standards ausgeschnitten. Dieser enthielt bezogen auf Arsen 21,3 ng/mL  $\text{AsNaO}_2$  (As(III)), 19,0 ng/mL  $\text{MeAsI}_2$  (MMAs(III)), 21,8 ng/mL  $\text{Me}_2\text{AsO}(\text{OH})$  (DMAs(V)), 23,3 ng/mL  $\text{MeAsO}(\text{ONa})_2$  (MMAs(V)), 21,8 ng/mL  $\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (As(V)).

Die HPLC Fraktionen wurden jeweils mit 3 mL Citratpuffer auf pH 5 eingestellt. Gleichmaßen wurden 500 µL des erwähnten Multi-Spezies Standards und eines MMAs(III) Einzelstandards (1,9 ng/mL  $\text{MeAsI}_2$  als Arsen) jeweils in einem 20 mL Gefäß für die Hydrierung vorbereitet.

*Tabelle 4.5: HPLC Parameter zur Trennung der Urinprobe*

Säule:	Prodigy 3µ ODS(3) 150 x 4,6 mm
Vorsäule	4mm x 3mm ID
Laufmittel	4,7 mM Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH), 2 mM Malonsäure, Methanol 4% (pH=5,91)
Temperatur	50°C
Flussrate	1,2 ml/Min
Laufzeit	10 Min

Das Gefäß wurde mit einem Septum verschlossen und das Gaseinleitstück (Aux 3) sowie der Gasauslass durch Einstechen der Kanülen angeschlossen. Zur effizienten Einkondensierung der leicht flüchtigen Hydride wurde die U-Rohr Kühlfalle (T2) entsprechend des in Kapitel 3.3.2 (S. 66) beschriebenen Aufbaus für den ersten Purge & Trap Schritt eingesetzt.

Mit der Ventilstellung, wie sie in Abbildung 3.7 C) (S. 68) dargestellt ist, wurden die

Hydride unter Verwendung von flüssigem Stickstoff als Kühlmittel für 2 Minuten auf dem bereits eingebauten U-Rohr einkondensiert. Die Refokussierung auf dem PTV Injektor wurde, wie bereits in Kapitel 4.1 (S. 80) beschrieben, durchgeführt.

Für die eigentliche Probenaufgabe durch die Thermodesorption im PTV blieben die Parameter in beiden Studien unverändert gegenüber den zuvor beschriebenen Einstellungen (s. Tab. 3.10 S.71).

Das für die EI-MS Detektion verwendete Massenfenster lag zwischen  $m/z$  73 und  $m/z$  125. Dieses Spektrum war ausreichend, da in dieser speziellen Anwendung vor allem der vorliegende Methylierungsgrad beziehungsweise die Verifizierung von Monomethylarsin als Produkt der Hydrierung von Interesse war. Für die Detektion des Arsens im ICP-MS wurde die Masse 75 verwendet. Eine Kontrolle auf isobare Störungen durch Chlorverbindungen war nicht notwendig, da über das EI-MS die Anwesenheit von Arsen bzw. Abwesenheit von Chlor qualitativ bestätigt werden konnte.

Alle weiteren Parameter hinsichtlich Chromatographie- und Detektionsbedingungen entsprechen für beide Studien den in Tabelle 3.10 (S. 71) und Tabelle 3.4 (S. 54) aufgelisteten Daten.

#### ♦ *Ergebnisse*

##### *Studie I*

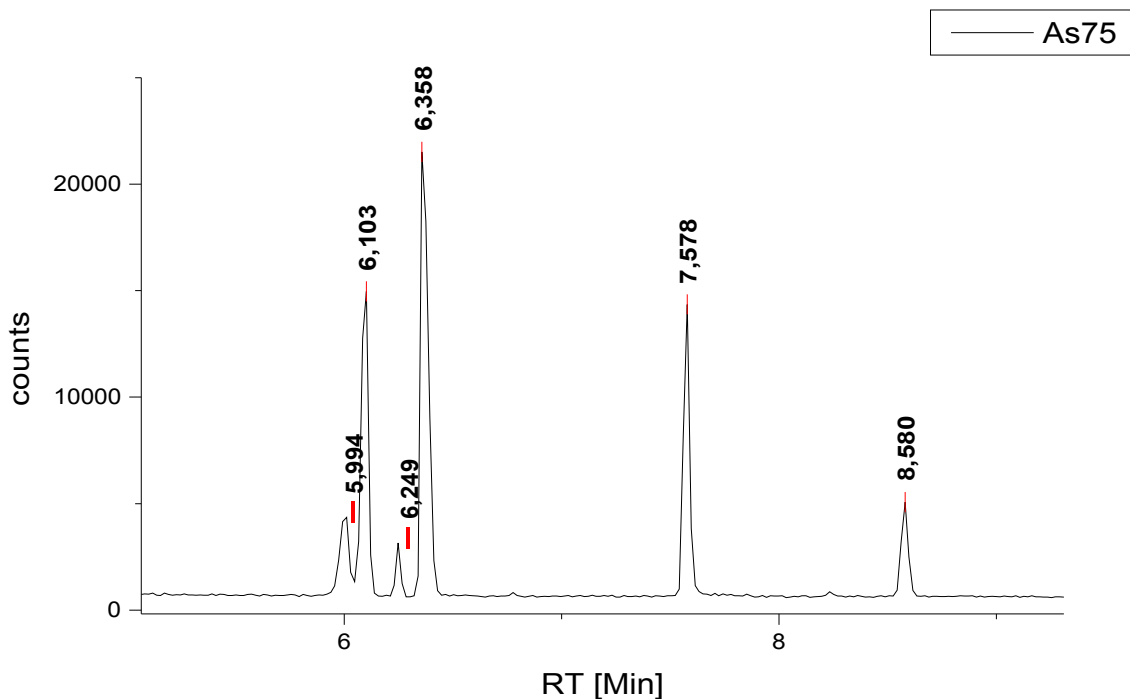
Nach Hydrierung der Bodenprobe ließen sich im ICP-MS sechs Arsen- und vier Antimonspezies detektieren wie die Chromatogramme der Massen 75 (s. Abb. 4.12 S. 108) und 121 (Abb. 4.13 S. 109) erkennen lassen.

Mit Ausnahme der Arsenspezies bei RT 8,58 Min ließen sich über ihre Massenspektren (s. Abb. 8.10 S. 142 u. Abb. 4.14 S. 110) sämtliche Verbindungen identifizieren.

Tabelle 4.6 (S. 108) zeigt die Zuordnung der Retentionszeiten für Arsen, Tabelle 4.7 (S. 109) die für Antimon. Soweit vorhanden wird dort auch auf die Belege durch Bibliotheksspektren verwiesen.

Das EI-Spektrum der Komponente bei RT 7,578 Min stimmte mit einem zuvor aufgenommenem Spektrum überein, dessen Massen den Fragmentationen des Methylidiarsins zugeordnet werden konnten [Kösters et al. 2003].

Die Massenspektren der hydrierten Antimonspezies ließen ebenfalls eine eindeutige Interpretation der Fragmentmassen zu (s. Abb. Abb. 4.14 S. 110).

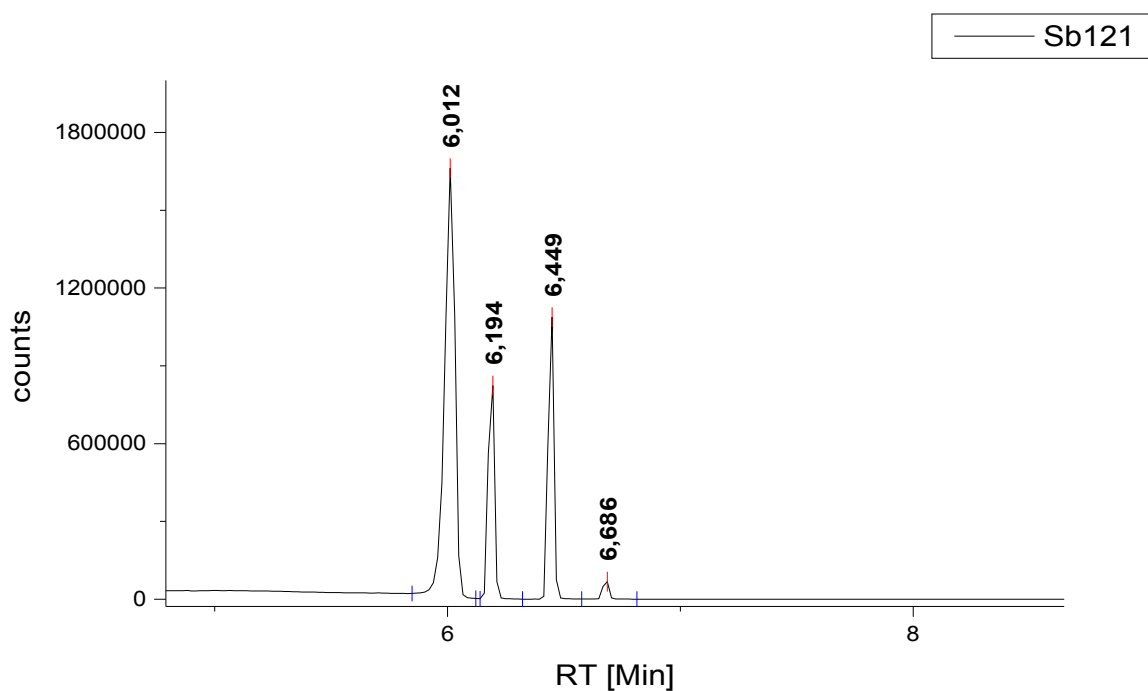


**Abbildung 4.12:** ICP-MS Chromatogramm (Ausschnitt) der Masse 75 (Arsen) nach Hydrierung einer Bodenprobe (Bundeswehr Altlast) und P & T Aufgabe.

*Tabelle 4.6: Zuordnung der Arsenspezies des in Abb. 4.12 gezeigten Chromatogramms. Massenspektren: s. Abb.8.10 (S. 142)*

RT <sub>EI-MS</sub> [Min]	RT <sub>ICP-MS</sub> [Min]	Verbindung	Beleg
5,926	5,994	Arsin (AsH <sub>3</sub> )	Bibliotheksspektrum (s. Abb.8.10 S. 142)
6,021	6,103	Monomethylarsin (MMAsH <sub>2</sub> )	Bibliotheksspektrum (s. Abb. 8.1S. 135)
6,173	6,249	Dimethylarsin (DMAsH)	Bibliotheksspektrum(s. Abb. 8.1S. 135)
6,292	6,358	Trimethylarsen (TMAs)	Bibliotheksspektrum (s. Abb. 8.1S. 135)
7,490	7,578	Methyldiarsin (MMAs <sub>2</sub> H <sub>3</sub> )	Zuordnung der Fragmentmassen [Kösters et al. 2003]
8,498	8,580	?	-

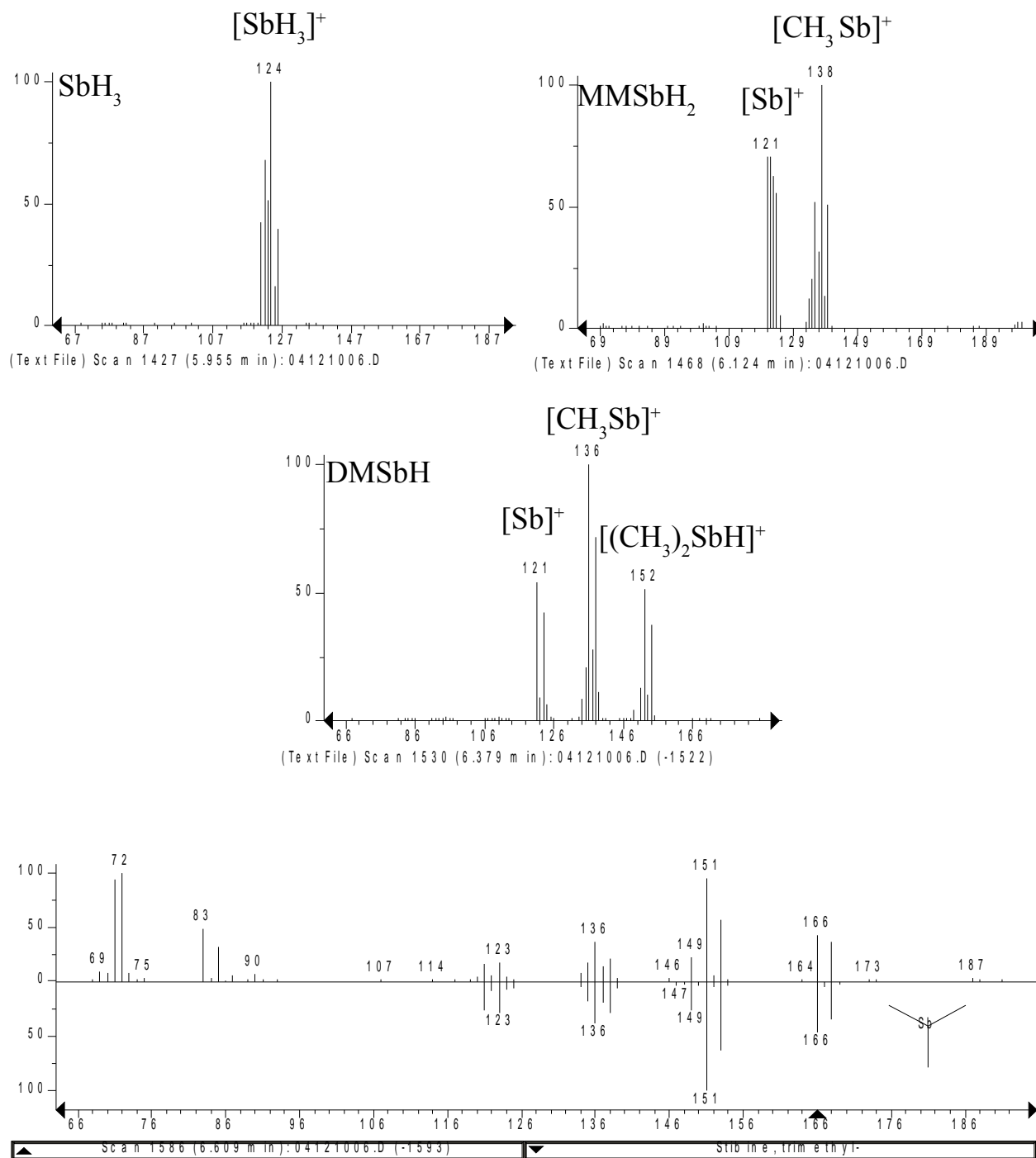




**Abbildung 4.13: ICP-MS Chromatogramm der Masse 121 (Antimon) nach Hydrierung einer Bodenprobe (Bundeswehr Altlast) und P & T Aufgabe.**

*Tabelle 4.7: Zuordnung der Antimonspezies des in Abb. 4.13 gezeigten Chromatogramms. Massenspektren: (s. Abb.4.14 S.110)*

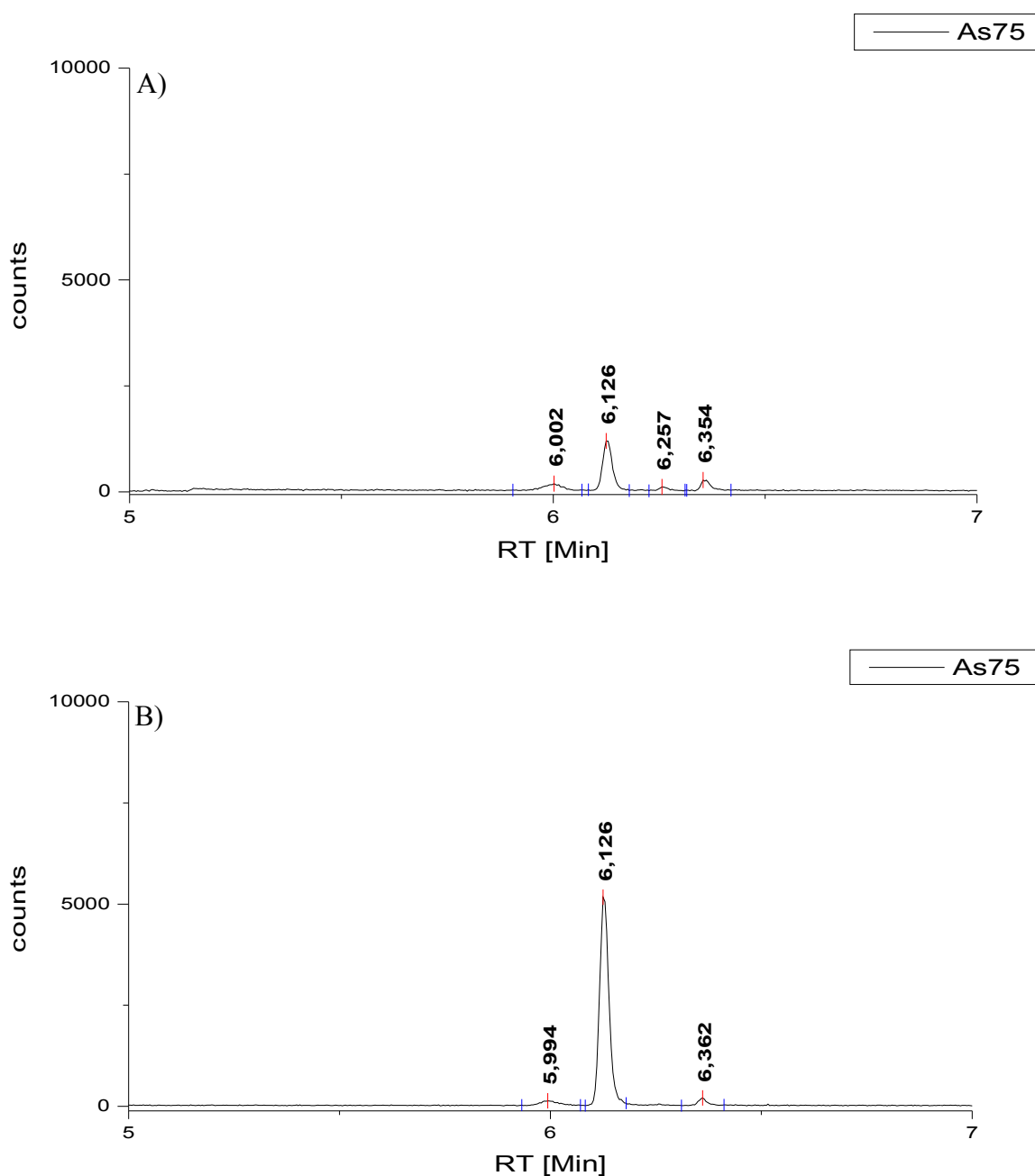
RT <sub>EI-MS</sub> [Min]	RT <sub>ICP-MS</sub> [Min]	Verbindung	Beleg
5,955	6,012	Stibin (SbH <sub>3</sub> )	Zuordnung der Fragmentmassen (s. Abb.4.14 S.110)
6,124	6,194	Monomethylstibin (MMSbH <sub>2</sub> )	Zuordnung der Fragmentmassen (s. Abb.4.14 S.110)
6,379	6,449	Dimethylstibin (DMSbH)	Zuordnung der Fragmentmassen (s. Abb.4.14 S.110)
6,609	6,686	Trimethylantimon (TMSb)	Bibliotheksspektrum (s. Abb.4.14 S.110)



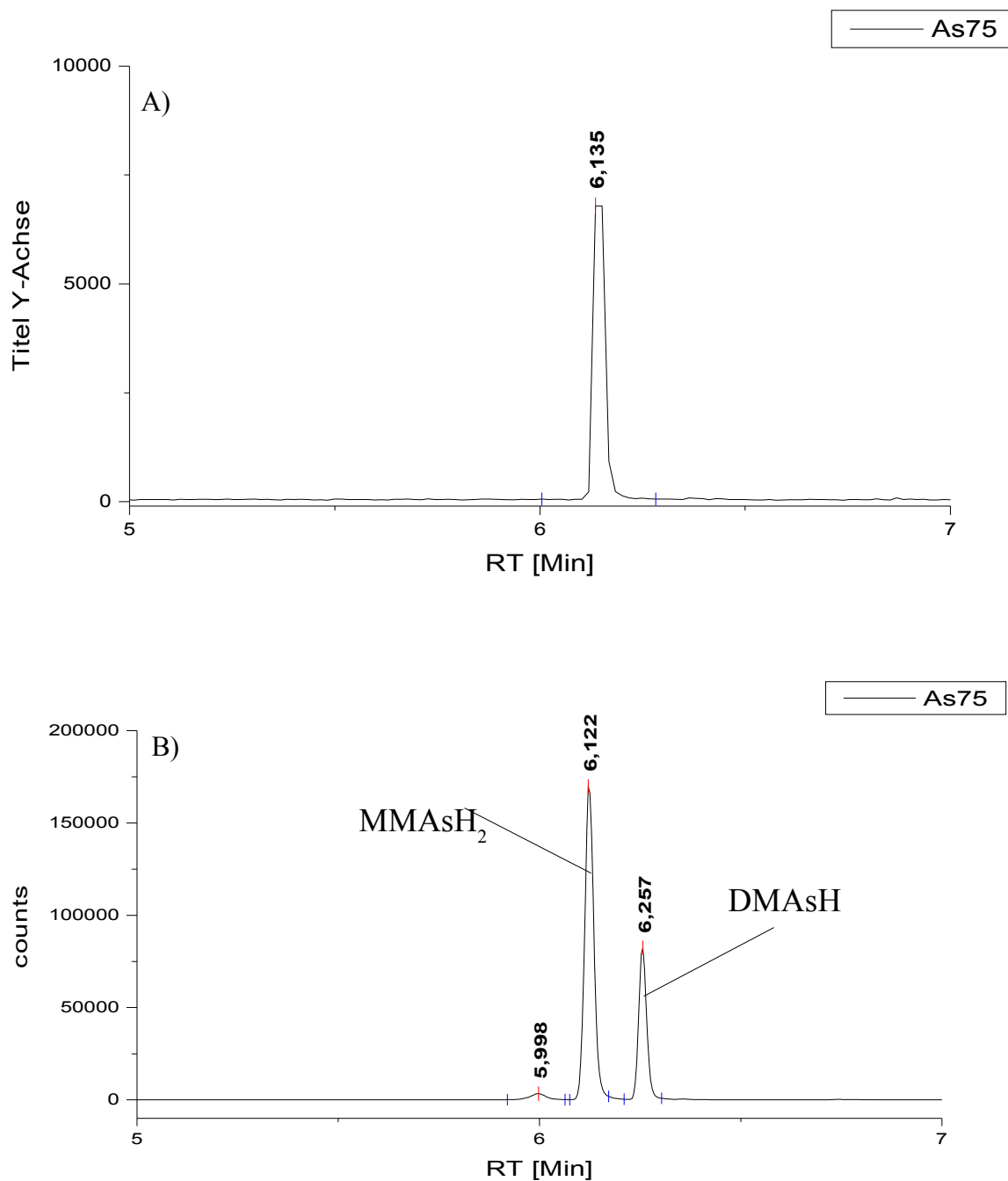
**Abbildung 4.14:** Massenspektren der in Abb. 4.13 S. 109 gezeigten Antimonpezies. Für die Zuordnung der Fragmentionen wurde das Antimonisotop 121 zugrunde gelegt

*Studie II*

Die folgenden Abbildungen 4.15 und 4.16 zeigen die Chromatogramme, die nach Hydrierung der ausgeschnittenen HPLC Fraktionen beziehungsweise der Standards mit der ICP-MS nach Purge & Trap Aufgabe und GC-Trennung aufgenommen wurden.



**Abbildung 4.15: ICP-MS Chromatogramme nach Hydrierung (pH 5) und P & T Aufgabe: A) MMA (III) ausgeschnitten aus HPLC Lauf einer Urinprobe (20  $\mu$ L) B) MMA(III) ausgeschnitten aus Multispeziesstandard (ca. 20 ng/mL As(III), MMA(III), DMA(V), MMA(V), As(V)).**



**Abbildung 4.16:** ICP-MS Chromatogramme nach direkter Hydrierung (pH 5) und P & T Aufgabe  
A) 500  $\mu\text{L}$  eines Einzelstandards (1,9 ng/mL MMA (III)) B) 500  $\mu\text{L}$  eines  
Multispeziesstandard (ca. 20 ng/mL As(III), MMA(III)), DMA(V), MMA(V), As(V)).

Über die direkt hydrierten Standards (Abb. 4.16 A) S. 112) konnten Massenspektren extrahiert werden, die durch Übertragung der Retentionszeiten im Chromatogramm der Probe (Abb. 4.15 A) S. 111) die eindeutige Identifizierung der Peaks bei 6,126 Minuten als Monomethylarsin und bei 6,257 Minuten als Dimethylarsin erlaubten.

Bei 6,002 und 6,354 Minuten lassen sich darüber hinaus zwei kleine Erhebungen in der Basislinie erkennen, die in ihren Retentionszeiten mit den Peaks übereinstimmen, die in der zuvor beschriebenen Studie über Massenspektren als Arsin beziehungsweise Trimethylarsen identifiziert worden sind (s. Tab. 4.6 S. 108).

#### ♦ *Diskussion*

Neben der Verifizierung der methylierten Arsen- und Antimonspezies war die Identifizierung einer Verbindung, die mit Standards nicht zugeordnet werden konnte, als Methyl-diarsin möglich. Diese Verbindung wurde bereits in anderen Untersuchungen nach Hydrierung einer Kompostprobe [Kösters et al. 2003] nachgewiesen. Obwohl diese Verbindung bisher nicht bei der Hydrierung von Standards beobachtet wurde, muss in Betracht gezogen werden, dass es sich um ein Artefakt der Hydrierung handelt. Aber erst durch die Aufklärung der Struktur mit Hilfe der EI-MS lassen sich diesbezügliche Studien gezielt planen und erhalten eine Vergleichbarkeit, die es prinzipiell ermöglicht, unabhängig von weiteren Systemparametern die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen in die Diskussion einzubeziehen.

Als sehr vorteilhaft erweist sich auch die Verwendung des unveränderten chromatographischen Systems, welches den Vergleich der Studien untereinander ermöglicht. So ergaben sich Übereinstimmungen der Retentionszeiten mit zuvor als nicht identifiziert charakterisierten Arsenpeaks aus den mikrobiologischen Studien (s. Tab. 4.1 S. 86 ) sowie mit den Signalen aus der Untersuchung der HPLC Fraktionen (vgl. Abb. 4.15 S.111 und Tab. 4.6 S. 108 ).

Mit Hilfe der zuletzt genannten Studie konnte gezeigt werden, dass der Einsatz der Gaschromatographie mit simultaner EI-MS und ICP-MS Detektion als zweite Dimension für die HPLC möglich ist. Auch wenn im vorliegenden Fall der direkte Nachweis nicht möglich war, stellt die der Flüssigchromatographie überlegene Reproduzierbarkeit der Technik - auch durch die indirekte strukturanalytische Verifizierung des Monomethylarsens als Hydrierungsprodukt - eine zusätzliche Absicherung dar, was gerade in der HPLC Analytik von großer Bedeutung ist. Denn so konnte erst kürzlich

gezeigt werden, dass unter bestimmten chromatographischen Bedingungen dimethylarsonige Säure (DMA (III)) und die fünfwertige Dimethylthioarsensäure ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As=S(OH)) koeluieren. Darüber hinaus entsteht die Thioarsensäure als Hauptprodukt, wenn man den vermeintlichen DMA (III) Standard auf eine bestimmte Art herstellt, was in der Vergangenheit zu verschiedenen Fehlinterpretationen geführt hat [Hansen et al. 2004].

Als zusätzlichen Hinweis darauf, dass in der HPLC Fraktion aus der Urinprobe vor der Derivatisierung eine dreiwertige Monomethylarsenverbindung vorlag, kann in diesem konkreten Fall die chemische Selektivität der Hydrierung angesehen werden. Da für die Reduktion des As(V) zum As (III) ein sehr niedriger pH-Wert (< 1) notwendig ist [Dedina und Tsalev 1995], wäre im Falle einer fünfwertigen Arsenverbindung bei dem verwendeten pH-Wert (pH 5) kein Methylarsin entstanden.

#### ***4.5 Identifizierung von Reaktionsprodukten bei der Untersuchung von Zerfallmechanismen metall(oid)organischer Verbindungen***

Die Frage nach Verteilung und Stabilität metall(oid)organischer Verbindungen in der Atmosphäre ist Gegenstand der Untersuchungen eines Forschergruppenprojekts aus der Physikalischen Chemie (G2). Vor dem Hintergrund dieser Fragestellung sollten Abbau- und Photolysemechanismen von Dimethylselen (DMSe) in der Troposphäre studiert werden.

Zur Untersuchung der dort ablaufenden Vorgänge durch Reaktion der Verbindung mit OH-Radikalen oder aufgrund photolytischer Reaktionen wurde der entsprechende Abbau von Dimethylselen in einer Reaktionskammer (s. Abb. 4.17) simuliert.

Diese sogenannte Smogkammer besteht aus einem Glas-Reaktor ( $\varnothing = 26$  cm,  $V = 44$  L), der mit Photolyselampen und einem Fouriertransformations-Infrarot (FTIR)-Spektrometer ausgestattet ist. Der Infrarotstrahl dieses Spektrometers wird über mit Gold beschichtete Spiegel in den Reaktor eingekoppelt und, nachdem er diesen durchlaufen hat, auf einen MCT (Mercury cadmium telluride)-Detektor (Bruker Optics, Ettlingen) fokussiert. Über eine Pumpe mit optional vorschaltbarem Partikelfilter kann die Gasphase entnommen werden (s. Abb. 4.17 S. 116) [pers. Mitteilung C. Lomann].

Durch Photolyse von Methylnitrit in Gegenwart von NO und O<sub>2</sub> werden in dieser Apparatur OH-Radikale erzeugt, deren Reaktion mit den zu untersuchenden Substanzen mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie zeitaufgelöst verfolgt werden kann.

Bei Zugabe einer Referenzsubstanz, deren OH-Geschwindigkeitskonstante bekannt ist, kann durch Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten die OH-Geschwindigkeitskonstante der zu untersuchenden Substanz relativ bestimmt werden.

Da viele der bei dieser Reaktion entstandenen, gasförmigen Produkte mittels Infrarotspektroskopie nicht identifiziert werden konnten, sollte eine Messung der Gasphase mit Hilfe der GC/EI-MS/ICP-MS Kopplung Hinweise liefern, welche Verbindungen hier vorlagen.

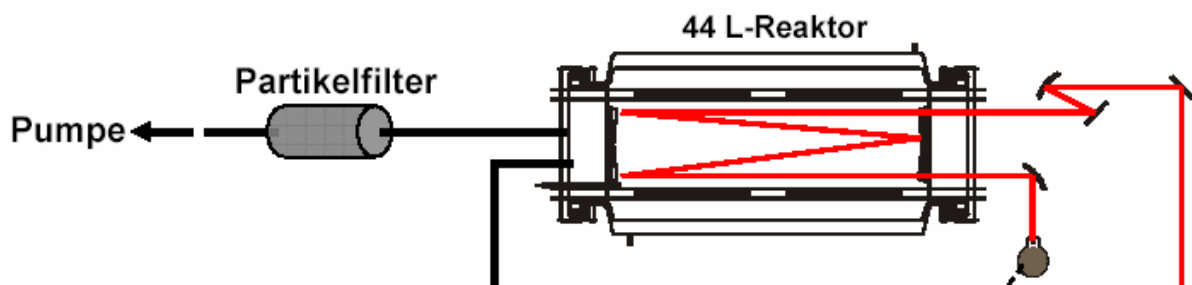


Abbildung 4.17: Reaktionskammer zur Untersuchung des radikalischen und photolytischen Abbaus von DMSe [pers. Mitteilung C. Lomann]

#### ♦ Experimentelles

In der beschriebenen Smogkammer wurde Dimethylselen (Strem, Kehl) mit einer Konzentration von 200 ppm den Photolysebedingungen ausgesetzt. Die Gasphase der Reaktionskammer wurde nach 10 Minuten Reaktionszeit über eine Pumpe abgesaugt und die Analyten dabei auf einer der beschriebenen U-Rohr Kühlfallen (s. Kap. 3.3.2 S. 66) durch Eintauchen in einen Dewar mit flüssigem Stickstoff einkondensiert.

Die Kühlfalle wurde mit einer Ventilstellung entsprechend Abbildung 3.7 D) (S. 68) in das Aufgabesystem eingebaut und der Widerstandsdraht an einen Trafo angeschlossen. Da der erste Purge & Trap-Schritt entfällt, verkürzt sich das chromatographische Programm um 5 Minuten.

Die Refokussierung auf dem PTV Injektor wurde, wie bereits in Kapitel 4.1 (S. 80) beschrieben, durchgeführt. Für die anschließende Probenaufgabe durch die Thermodesorption im PTV blieben die Parameter unverändert gegenüber den zuvor beschriebenen Einstellungen (s. Tab. 3.10 S.71).

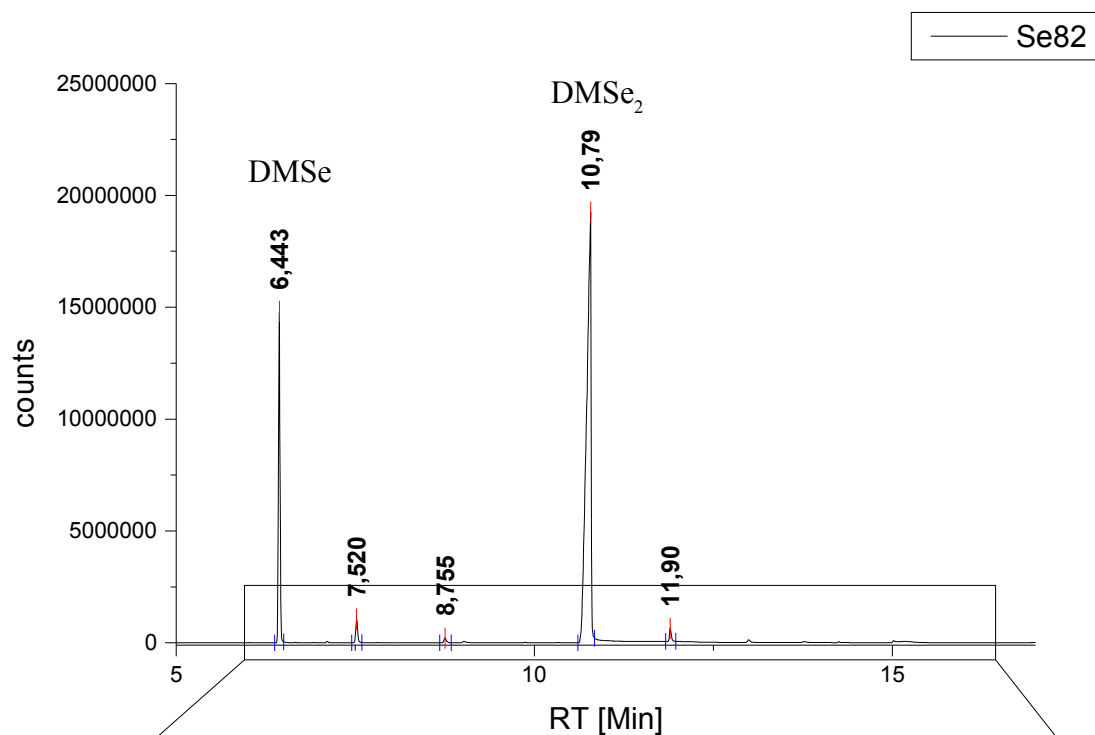
Der für die EI-MS Detektion verwendete Scan-Bereich lag zwischen  $m/z$  30 und  $m/z$  350. Für die Detektion im ICP-MS wurde die Masse 82 gewählt.

#### ♦ Ergebnisse

Das Chromatogramm der Messung (s. Abb. 4.18 A) S. 117) zeigt zwei Hauptkomponenten, die über ihr Fragmentmassenspektrum und den Vergleich mit den Bibliotheksspektren als Dimethylselen (DMSe) und Dimethyldiselen (DMSe<sub>2</sub>) identifiziert wurden. Wie in der Ausschnittsvergrößerung dieses Chromatogramms (s. Abb. 4.18 B) ) zu sehen ist, konnte aber eine Vielzahl kleinerer Peaks beobachtet werden.



A)



B)

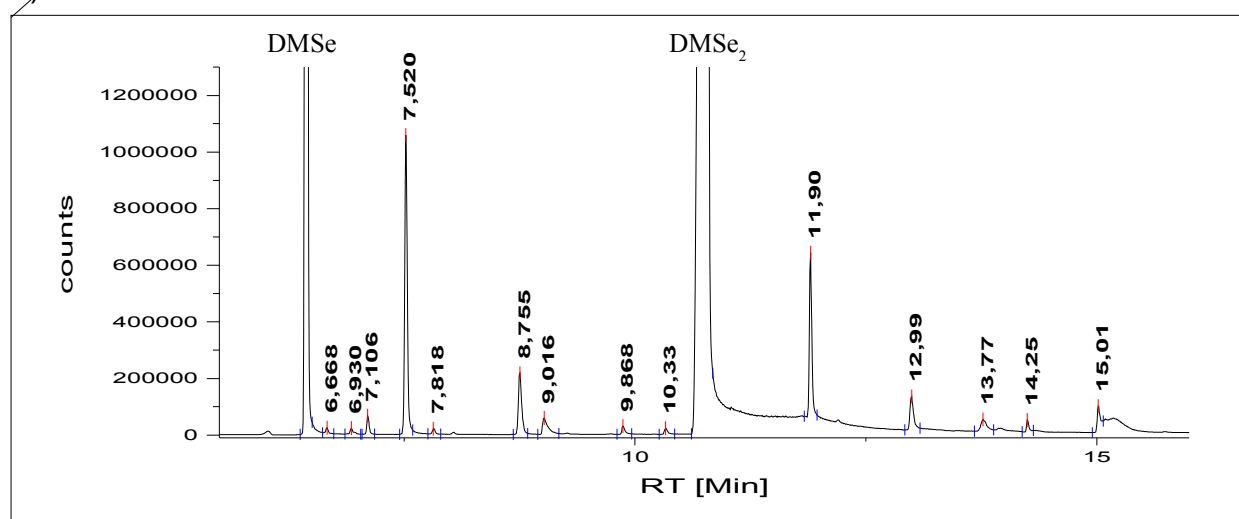


Abbildung 4.18: A) ICP-MS Chromatogramm für  $m/z$  82 zur Untersuchung der gasförmigen Reaktionsprodukte des oxidativen und photolytischen Abbaus von Dimethylselen  
B) Ausschnittsvergrößerung

Stöchiometrisch betrachtet lassen sich diese Spezies über eine Abschätzung der Peakhöhen relativ zum Dimethyldiselen dem Spurenbereich zuordnen. Die Signalstärken dieser Selenspezies waren aber ausreichend, um für fast alle Verbindungen ein Massenspektrum zu erhalten.

Für die Spezies, die über ein Vergleichsspektrum aus der Bibliothek identifiziert werden konnten, sind diese in Abbildung 4.19 (S. 120) dem gemessenen Fragmentogramm gegenüber gestellt.

Für zwei der Verbindungen ließ sich eine evidente Zuordnung der Fragmentationen treffen und so auf die entsprechende Struktur des Moleküls schließen. Diese Spektren werden in Abbildung 4.20 und 4.21 (S. 121) gezeigt. Den Hauptpeaks wurden hierin die sich entsprechend der vermuteten Molekülstruktur ergebenden Fragmentationen zugewiesen.

Die Massenspektren der Spezies, die aufgrund der mit dem Selensignal der ICP-MS übereinstimmenden Retentionszeit und der zu beobachtenden Isotopenmuster als Selenverbindung erkannt wurden, aber nicht genauer identifiziert werden konnten, sind in Abbildung 8.11 (S. 143), 8.12 (S. 144), 8.13 (S. 145) und 8.14 (S. 146) dargestellt. Tabelle 4.8 (S. 119) fasst diese Resultate zusammen.

Tabelle 4.8: Zuordnung der detektierten Selenspezies nach oxidativem und photolytischem Abbau

RT EI-MS [Min]	RT ICP-MS [Min]	Verm. Verbindung	Beleg
6,597	6,668	Carboselenid (SeCS)	Bibliotheksspektrum (s. Abb. 4.19 S. 120)
6,83	6,93	Ethenylmethylselen (SeC <sub>3</sub> H <sub>6</sub> )	Zuordnung der Fragmentionen (s. Abb. 4.20 S. 121)
7,04	7,11	?	Massenspektrum (s. Abb. 8.11 S. 143)
7,45	7,52	Carbondiselenid (Se <sub>2</sub> C)	Bibliotheksspektrum (s. Abb. 4.19 S. 120)
7,76	7,82	Selenophen (SeC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> )	Bibliotheksspektrum (s. Abb. 4.19 S. 120)
8,68	8,76	?	Massenspektrum (s. Abb. 8.11 S. 143)
8,91	9,02	?	Massenspektrum (s. Abb. 8.12 S.144)
9,79	9,87	?	Massenspektrum (s. Abb. 8.12 S.144)
10,26	10,33	?	Massenspektrum (s. Abb.8.13 S.145)
11,83	11,90	Ethenylmethyldiselen (Se <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> )	Zuordnung der Fragmentionen (s. Abb.4.21 S.121)
12,92	12,99	Bis(Methylseleno)methan (Se <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> )	Bibliotheksspektrum (s. Abb. 4.19 S. 120)
13,66	13,77	?	Massenspektrum (s. Abb.8.13 S.145)
14,21	14,25	?	Massenspektrum (s. Abb 8.14 S. 146)
14,97	15,00	Triselenoethan (Se <sub>3</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	Bibliotheksspektrum (s. Abb. 4.19 S. 120)
?	15,19	?	Kein Massenspektrum (vermutlich keine eigene Verbindung)

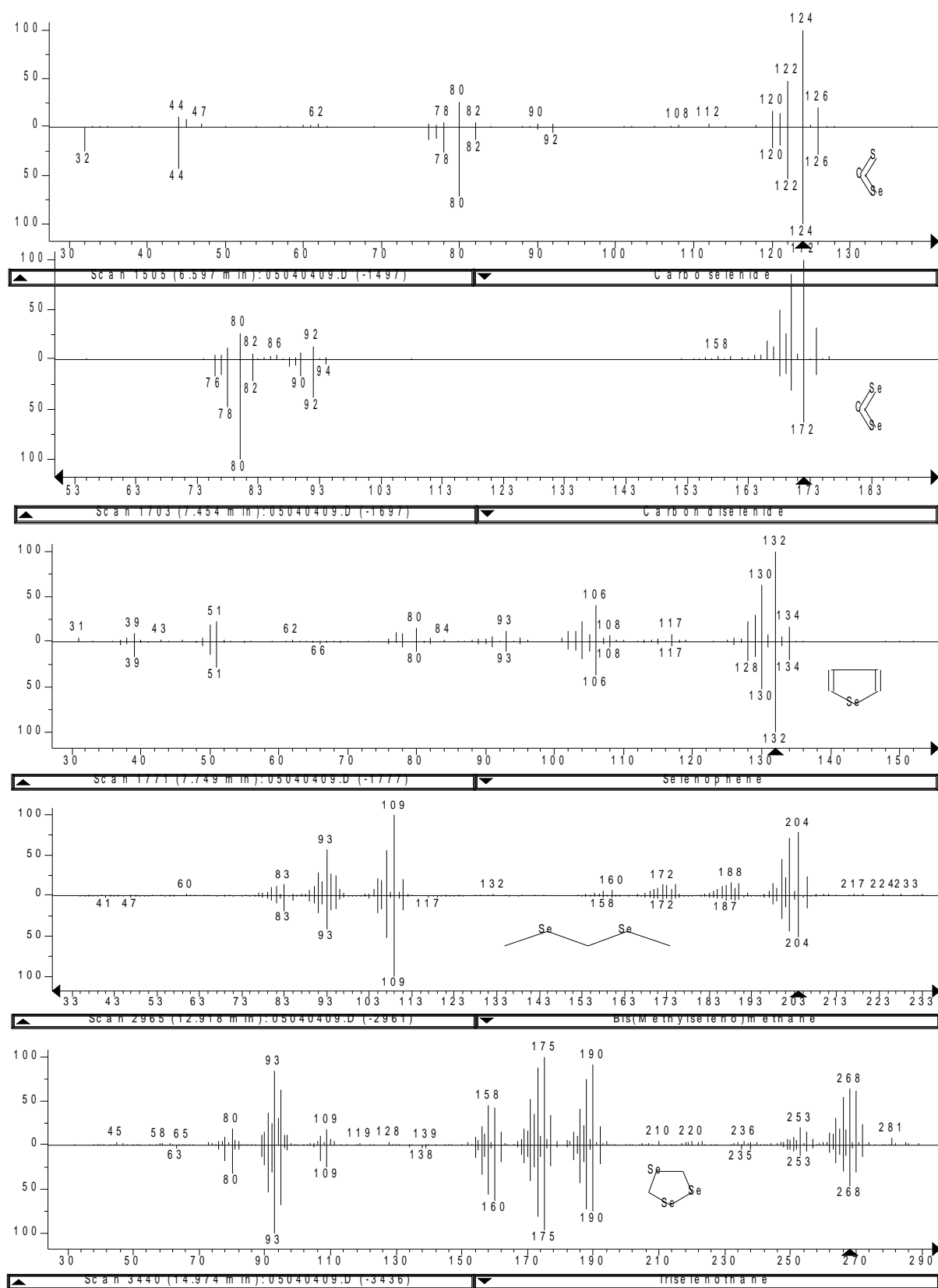
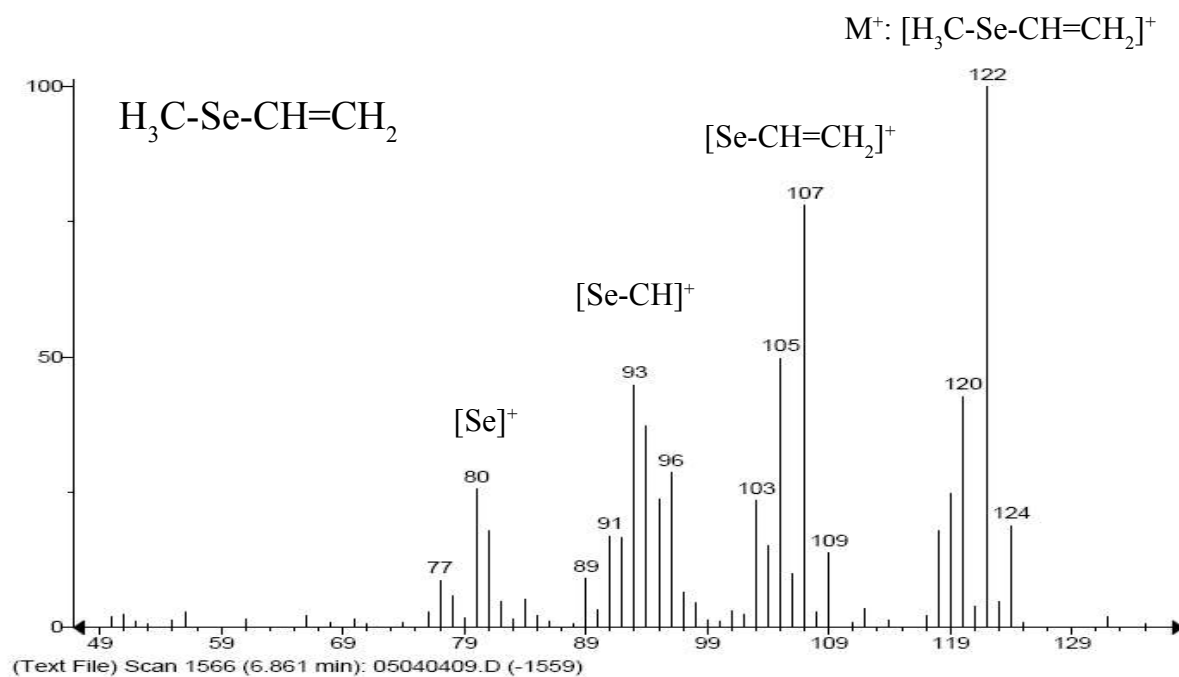
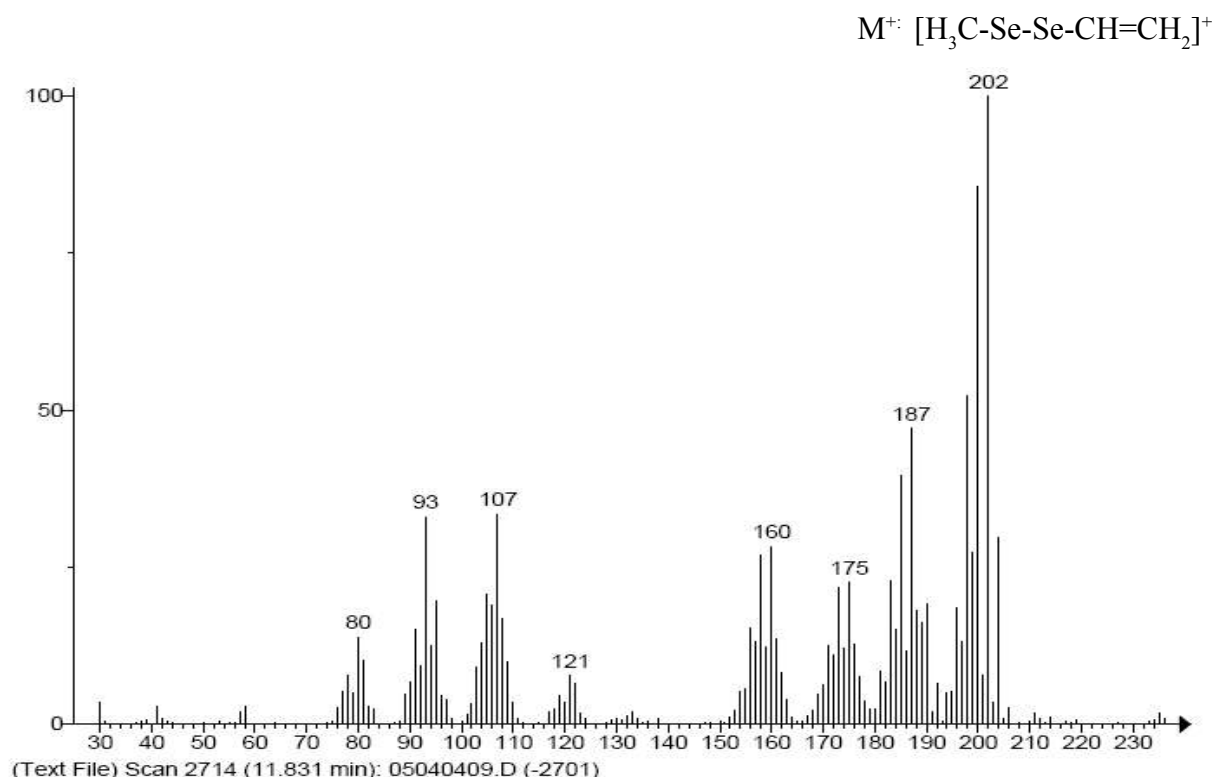


Abbildung 4.19: Identifizierte Selspezies nach oxidativem und photolytischem Abbau mit Bibliotheksspektren



**Abbildung 4.20: Zuordnung möglicher Fragmentationen des Ethenylmethylselens für das EI-Massenspektrum bei RT 6,86 Min.**



**Abbildung 4.21: Zuordnung möglicher Fragmentationen des Ethenylmethyldiselens für das EI-Massenspektrum bei RT 11,83 Min.**

♦ *Diskussion*

Die Übereinstimmung der Bibliotheksspektren mit den gefunden Massenspektren stellen einen überzeugenden Beleg für die Richtigkeit der strukturellen Zuordnung dar. In Kombination mit den elementspezifischen Nachweis des Selens zu der jeweiligen Retentionszeit durch das ICP-MS kann von einer gesicherten Identifizierung dieser Verbindungen gesprochen werden. Gleiches gilt für die Zuordnung der Fragmentationen. Die Hauptmassen konnten dabei jeweils Fragmentationen zugewiesen werden, deren Entstehung sich ausgehend vom Molekülion ( $M^+$ ) durch sequentielle  $\sigma$ -Bindungsbrüche sowie Wasserstoffabstraktionen erklären lässt.

Lediglich zur Entstehung des Fragmentions mit der Masse 121 ( $[H_3C-Se-CH=CH_2]^+$ , s. Abb. 4.21 S. 121) wäre zusätzlich eine Rekombination mit einem  $CH_2$ -Fragment nötig. Eine solche Reaktion besitzt statistisch betrachtet zwar keine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, ist aber dennoch möglich, wie das Beispiel des Dimethyldiselens zeigt. Dessen Massenspektrum, welches durch ein Bibliotheksspektrum belegt werden konnte (s. Abb. 4.3 S. 83), weist eine Fragmentationengruppe um die Masse 109 auf, die sich nur durch die nachträgliche Anlagerung eines  $CH_2$ -Fragments an ein Selenatom nach dem Bruch der Se-Se-Bindung erklären lässt. Eine analoge Reaktion ist daher auch bei der hier vermuteten Diselenverbindung denkbar.

Die Massenpeaks um die zugeordneten Hauptmassen spiegeln das Isotopenmuster des Selens wider. Aufgrund von Wasserstoffabstraktionen finden allerdings zum Teil Überlagerungen statt, wodurch Abweichungen von diesem Muster zu beobachten sind. Da die Mengen der in der Gasphase identifizierten Verbindungen relativ zum Hauptprodukt im Spurenbereich lagen, waren diese Ergebnisse aus mechanistischer Sicht weniger hilfreich.

Es konnte jedoch losgelöst von der konkreten Fragestellung dieses Experimentes erfolgreich demonstriert werden, dass die vorgestellte Kopplungsmethode in der Lage ist, auch ein breites Speziesspektrum chromatographisch zu erfassen und mit relativ geringem Aufwand durch die simultan erfassten Massenspektren einen Großteil dieser unbekannten Spezies zu identifizieren. Die routinemäßige Aufnahme eines elementspezifischen Chromatogramms mit ICP-MS hat wesentlich dazu beigetragen, die Auffindung der Selenspezies im EI-MS Chromatogramm zu erleichtern und deren Anwesenheit zu verifizieren.

## 5 Ausblick

Neben dem Einsatz der vorgestellten Methode zur Analyse von Metall- und Metalloidverbindungen ist darüber hinaus die Untersuchung halogen-, schwefel-, oder phosphorhaltiger Verbindungen hochinteressant.

Denn durch die Detektion des Elementsignals stünde eine äußerst nachweisstarke Analysenmethode zur Verfügung, die beispielsweise für die Spurenanalytik von Pestiziden, Flammenschutzmitteln und anderen elementorganischen Verbindungen, die wegen ihres Gefährdungspotentials in der Diskussion stehen, eingesetzt werden könnte. Mit Hilfe der molekülspezifischen Informationen der EI-MS wäre dann auch für diese Verbindungen die routinemäßige Verifizierung bekannter Schadstoffe und die Identifizierung unbekannter Spezies möglich.

Hierbei wäre allerdings die Verwendung alternativer ICP-MS Systeme wie der HR- oder der CC-ICP-MS sinnvoll, die aufgrund ihrer hohen Massenauflösung, bzw. mit Hilfe der Kollisionszellen-Technologie, das analysierbare Elementspektrum deutlich erweitern (vgl. Kap. 2.3.2 S. 34).

Als limitierender Faktor für die Identifizierung der zu untersuchenden Verbindungen stellte sich in einigen Fällen die verringerte Empfindlichkeit heraus, die die EI-MS im „scan“ Modus besitzt. Der Einsatz neuerer EI-MS Systeme, die durch Verwendung inerterer Materialien in der Ionenquelle ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis versprechen, könnten bei diesem Problem Abhilfe schaffen.

In Fällen, in denen die absolute Substanzmenge zu gering ist, um ein Massenspektrum zu bekommen, könnte die herstellerseitige Optimierung hinsichtlich der Konstruktion des PTV-Injektors mit dem Ziel einer splitlosen Purge & Trap-Aufgabe sehr hilfreich sein.

Auch ein variabler Split nach der Säule, der - je nach Anforderung - die zur Strukturanalyse verwendete Analytmenge dosieren kann, wäre in diesem Zusammenhang sehr sinnvoll.





## 6 Zusammenfassung

Zum Nachweis flüchtiger elementorganischer Verbindungen werden derzeit entweder nur elementspezifische oder nur molekülspezifische Detektoren verwendet, obwohl gerade die Kombination dieser komplementären Detektionstechniken als äußerst vielversprechend angesehen werden kann.

Wie in Kapitel 2.3.3 (S. 37) bereits formuliert wurde, sollte daher durch die Kopplung der entsprechenden Instrumente die technische Realisierbarkeit der parallelen EI-MS und ICP-MS Detektion nach gaschromatographischer Trennung geprüft werden.

Die vorgelegte Arbeit zeigt die konzeptionelle und konstruktive Umsetzung dieses Vorhabens, die analytische Validierung der dazu entwickelten Methode sowie abschließend ausgesuchte Applikationen und Studien zur Demonstration der Anwendbarkeit in Bezug auf verschiedenste Aufgabenstellungen.

Mit dem vorgestellten Gesamtsystem aus Probenaufgabe, gaschromatographischer Trennung und nahezu simultaner Detektion durch EI-MS und ICP-MS konnte eine in dieser Form noch nicht realisierte Analysemethode präsentiert werden, die in ausreichender Nachweisstärke elementspezifische und quantitativ validierbare Daten liefert und gleichzeitig die Abfrage molekülspezifischer Daten zur qualitativen Verifizierung erlaubt.

Durch die synchronisierte Erfassung sowohl elementspezifischer als auch molekülspezifischer Daten konnte die Interpretation komplexer EI-MS Chromatogramme vereinfacht werden, da die Zuordnung der Elementinformation des ICP-MS zur fraglichen Retentionszeit die Auffindung der Peaks erheblich erleichtert.

Die Vorzüge, die die ICP-MS-Technologie hinsichtlich niedriger Nachweisgrenzen und einer hohen Linearität in der Quantifizierung aufweist, blieben hierbei erhalten, wie die Bestimmung der analytischen und chromatographischen Rahmenparameter mit Hilfe der Iodalkanstandards belegen konnte. Gleichzeitig wurde hierdurch die Funktionsfähigkeit der Kopplung hinsichtlich der Aufteilung des Gasstroms und des Transfers der Analyten zum ICP-MS bestätigt. Durch die gezeigten Applikationen konnte dieser Nachweis auch für Realproben erbracht werden.

Diese exemplarischen Studien konnten darüber hinaus in Bereichen wie der Metabolismusforschung und der Arbeitsmedizin sowie bei der Untersuchung mikrobiologischer Umwandlungsprozesse das breite Anwendungspotential der Methode

verdeutlichen.

So konnte demonstriert werden, dass man mit der Verifizierung über die EI-Massenspektren in der Lage ist, der bei der Untersuchung von gasförmigen Spezies verstärkt auftretenden Problematik der mangelhaften Verfügbarkeit von Standards wirkungsvoll zu begegnen.

Durch die routinemäßige Anwendung der parallelen Detektionstechnik bei der Untersuchung von Bismutverbindungen war es möglich Zwischenstufen der mikrobiellen Methylierung von Bismut nachzuweisen und deutliche Hinweise auf die Bildung von Methylbismutverbindungen in menschlichen Darmtrakt zu liefern

Und auch wenn eine Überprüfung der Effizienz der Ethylierung aufgrund des Mangels an stabilen Standards nicht möglich war, sollte als ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit festgehalten werden, dass die Volatilisierung von Methylbismutverbindungen mit der beschriebenen Derivatisierungsmethode in verschiedenen Matrices möglich ist und somit zur Trennung der Analyten von der Matrix eingesetzt werden kann.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass bei der Überprüfung von Standards, mit Hilfe von Strukturinformationen der umständliche und zum Teil gefährliche Einsatz toxischer Standards vermieden und die Aufklärung von Messartefakten vereinfacht werden kann.

Veranschaulicht wurde darüber hinaus die ausgeprägte Multielementfähigkeit, die die Methode aufgrund des ICP-MS Detektors besitzt, dessen Flexibilität und Variabilität hinsichtlich der simultan erfassbaren Elemente kein anderer Detektor bietet.

Unabhängig von den konkreten Fragestellungen der Experimente konnte erfolgreich demonstriert werden, dass die vorgestellte Kopplungsmethode in der Lage ist, ein breites Spektrum flüchtiger Elementspezies chromatographisch zu erfassen und durch die simultan aufgenommenen Massenspektren auch zu identifizieren .

Die Vielseitigkeit der gezeigten Anwendungen hinsichtlich Thematik und untersuchter Probenmatrix bestätigt dabei die erfolgreiche Realisierung eines variablen Probenaufgabensystems und dessen Einbindung in das Gesamtkonzept.

Dieses erlaubt zum einen den Einsatz gängiger Standardtechniken zur Probenaufgabe, wie der Injektion von Flüssigkeiten oder Headspace-Proben sowie SPME Techniken. Darüber hinaus wurde durch die Kombination eines flexiblen Autosamplers mit einem weitgehend automatisierten Purge & Trap-System die reproduzierbare Aufgabe von gasförmigen Proben ermöglicht.

Letzteres konnte anhand unterschiedlicher Untersuchungen von Realproben sowohl für on-line Anwendungen als auch unter Verwendung von off-line befüllten Kühlfallen

erfolgreich gezeigt werden. Der Forderung nach der Einsetzbarkeit für unterschiedlichste Fragestellungen, unter Erhalt der Vergleichbarkeit der Methoden, wurde dabei durch die Verwendung desselben automatisierten Injektionssystems Rechnung getragen.

Abschließend soll betont werden, dass, nicht zuletzt aus Gründen der Qualitätssicherung, die Identifikation einer unbekannten oder vermeintlich bekannten Verbindung, allein aufgrund von Retentionszeiten, nicht mehr als hinreichend betrachtet werden kann.

Statt dessen sollte die dringende Empfehlung gegeben werden, die strukturelle Identität des Analyten zusätzlich mit molekularen MS-Techniken zu verifizieren, wie es zumindest vereinzelt bei flüssigen Proben durch die parallele Kopplung von HPLC mit ESI-MS und ICP-MS gemacht wird. Dabei ist generell die parallele Detektion unter Verwendung eines chromatographischen Systems zu bevorzugen, da nur so zu gewährleisten ist, dass die gleiche Spezies aus ein und derselben Probe die Detektoren erreicht.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die simultane Nutzung von ICP-MS und EI-MS Detektion nach gaschromatographischer Trennung technisch realisierbar und in der Praxis einsetzbar ist, sollte der routinemäßige Einsatz dieser Technik auch für die Untersuchung flüchtiger und insbesondere derivatisierter Elementspezies ernsthaft erwogen werden, wenn der Anspruch einer gewissenhaften und verlässlichen Analytik erhoben wird.



## 7 Literaturverzeichnis

Akagi, H., Malm, O., Branches, F. J. P., Kinjo, Y., Kashima, Y., Guimaraes, J. R. D., Oliveira, R. B., Haraguchi, K., Pfeiffer, W. C., Takizawa, Y., Kato, V., *Water Air Soil Pollut.*, 80, 85, 1995

Andrewes, P., Cullen, W.R., In: Craig, P.J. (Hrsg.), *Organometallic compounds in the environment*, John Wiley and Sons, Chichester, 2003

Andrewes, P., Demarini, D.M., Funasaka, K., Wallece, K., Lai, V.W.M., Sun, H., Cullen, W.R., Kitchen, K., *Environ. Sci. Technol.*, 38, 4140-4148, 2004

Aposhian, H.V., Gurzau, E.S., Le, X.C., Gurzau, A., Healy, S.M., Lu, X., Ma, M., Yip, L., Zakharyan, R. A., Maiorino, R. M., *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 693-697, 2000

Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Avram, M.D., Sampayo-Reyes, A., Wollenberg, M.L., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 198, 327-355, 2004

Atchinson, W.D., Hare, M.F., *FASEB J.*, 8, 622, 1994

Audier, H.E., *Org. Mass Spectrom.*, 2, 283-298, 1969

Bayon, M.M., Cambor, M.G., Alonso, J.I.G., Sanz-Medel, A., *J. Anal. At. Spektrom.*, 14, 1317-1322, 1999

Bennet, R.F., In: De Mora, S.J. (Hrsg.), *Tributyltin: Case study of an environmental contaminant*, Cambridge Press, Cambridge, 1996

Bentley, R., Chasteen, T.G., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 250-271, 2002

Block, E., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 401, 155-169, 1996

Boening, D.W., *Chemosphere*, 40, 1335-1351, 2000

Bouyssiére, B., Szpunar, J., Lobinsky, R., *Spectrochim. Acta B*, 57, 805-828, 2002

Brinckman, F.E., Bellama, J.M., *ACS Symp. Ser.*, 82, 447, 1978

Budzikiewicz, H., Schäfer, M., *Massenspektrometrie*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005

Buge, A., Rancurel, G., Poisson, Dechy, H., *Nouv. Presse Méd.*, 3, 2315, 1974

Bundesgesundheitsblatt 2003, Stoffmonographie Arsen - Referenzwert für Urin, Springer

Verlag, Berlin, 2003

Caruso, J.A., Montes-Bayon, M., *Ecotox. Environm. Safety*, 56, 148-163, 2003

Chau, Y.K., Wong, P.T.S, In: Craig, P.J. (Hrsg.), *Organometallic compounds in the environment*, Longman, Harlow, 1986

Chen, J., Zhou, L.M., Qu, G.L., *Chin. J. Anal. Chem.*, 29, 1276-1279, 2001

Clarkson, T.W., *Environ. Health Prespect.*, 110, 11, 2002

Cox, P.A., *The elements: Their origin, abundance and distribution*, Oxford University Press, Oxford, 1989

Craig, P.J., *Organometallic compounds in the environment*, Longmansgroup Harlow, 1986

Craig, P.J., Gloeking, F., *The biological alkylation of heavy metals*, The Royal Society of Chemistry, London, 1998

Craig, P.J., Maher, W.A., In: Craig, P.J. (Hrsg.), *Organometallic compounds in the environment*, John Wiley and Sons, Chichester, 2003

D'Itri, F.M., *Environ. Monit. Assess*, 19, 165, 1991

Davies, A.G., *Organotin chemistry*, VCH, Weinheim, 1997

Davies, I.M., Bailey, S.K., Harding, M.J., *ICES J. Mar. Sci.*, 55, 177-221,

De Smaele T., Vercauteren, J., Moens L, Dams R., Sandra, P., *Americ. Lab.*, 8, 39-40, 2001

Dedina, J., Tsalev, L., *Hydride generation atomic absorption spectrometry*, Wiley, New York, 1995

Demuth N., Heumann K. G., *Anal. Chem.*, 73, 4020-4027, 2001

Diaz-Bone, *Untersuchung metall(oid)organischer Verbindungen nach biologischer Abfallbehandlung mittels einer neu entwickelten GC/ICP-MS-Methode*, Dissertation (eingereicht), Universität Duisburg-Essen, 2006

Dodd, M., Pergantis, S.A., Cullen, W.R., Li, H., Eigendorf, G.K., Reimer, K., *Analyst*, 121, 223-228, 1996

- Dopp, E., Hartmann, L.M., Florea, A.M., Rettenmeier, A.W., Hirner, A.V., *Crit. Rev. Tox.*, 34, 301-333, 2004
- Düster, L., Diaz-Bone, R.A., Kösters, J., Hirner, A.V., *J. Environ. Mon.*, 7, 1186-1193, 2005
- Edler, M., Metze, D., Jakubowski, N., Linscheid, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, 1-5, 2002
- Edmonds, J.S., Francesconi, K.A., In: Craig, P.J (Hrsg.), *Organometallic compounds in the environment*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2003
- Feldmann, J., Erfassung flüchtiger Metall- und Metalloidverbindungen in der Umwelt mittels GC/ICP-MS, Dissertation, UHG Essen, 1995
- Feldmann, J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 12, 1069, 1997
- Feldmann, J., *Trends Anal. Chem.*, 24, 228-242, 2005
- Feldmann, J., Devalla, S., Raab, A., Hansen, H.R., In: Hirner, A.V., Emons, H. (Hrsg.), *Organic metal and metalloid species in the environment*, Springer-Verlag, Berlin, 2004
- Feldmann, J., Grümping, R., Hirner, A.V., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350, 228, 1994
- Ford, T., Ryan, D., *Environ. Health Perspect.*, 103, 25, 1995
- Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., *Adv. Inorg. Chem.*, 44, 147, 1997
- Francesconi, K.A., Tanggaard, R., McKenzie, C.J., Goessler, W., *Clin. Chem.*, 48, 92-101, 2002
- Gallus, S.M., Heumann, K.G., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, 887-892, 1996
- Gebel, T.W., Birkenkamp, P., Luthin, S., Dunkelberg, H., *Anticancer Res.*, 18, 4253, 1998
- Glindemann, D., Ilgen, G., Herrmann, R., Gollan, T., *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, 1386-1389, 2002
- Grüter, U.M., Kresimon, J., Hirner, A.V., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368, 67-72, 2000
- Gupta, N., Porter, T.D.J., *Biochem. Mol. Toxicol.*, 16, 18-23, 2002
- Hansen, H.R., Raab, A., Jaspars, M., Milne B.F., Feldmann, J., *Chem. Res. Toxicol.*, 17, 1086-1091, 2004

- Hirner, A.V., Hartmann, L. M., Hippler, J., Kresimon, Michalke, K., Sulkowski M., J., Kösters, J., Rettenmeier, A.W., In: Hirner, A.V. und Emons, H. (Hrsg.), *Organic metal and metalloid species in the environment*, Springer-Verlag, Berlin, 2004
- Hoppe, H.W., In: DFG, Deutsche Forschungs Gemeinschaft (Hrsg.), *The MAK-Collection Part IV: Biomonitoring Methods*, Vol. 10, Wiley-VCH, Weinheim, 2006
- Jensen, K.G., Andersen, O., Ronne, M., *Mutat. Res.*, 246, 109-112, 1991
- Kaise, T., Fukius, S., *Appl. Organomet. Chem.*, 6, 155-160, 1992
- Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J., Casarett and Doull's Toxicology-The basic science of poisons, Macmillian, New York, 1986
- Kösters, J., Vergleich verschiedener Derivatisierungsmethoden zur Analyse nicht flüchtiger Organometallverbindungen mittels CGC/ICP-MS, Diplomarbeit, UGH Essen, 2002
- Kösters, J., Diaz-Bone, R.A., Planer-Friedrich, B., Rothweiler B. Hirner AV, *J. Mol. Struc.*, 661, 347-356, 2003
- Kösters, J., Hippler, J., Diaz-Bone, R.A., Hirner, A.V., *J. Anal. At. Spectrom.*, 20, 996-999, 2005
- Kremer, D., Ilgen, G., Feldmann, F., *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, 509-515, 2005
- Kresimon, J., Grüter, U.M., Hirner, A.V., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, 586-590, 2001
- Krupp E. M., Pecheyran, C. Meffan-Main, S., Donard O. F. X., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 370, 573-580, 2001
- Krupp, E.M., Analytik umweltrelevanter Metall(oid)spezies mittels gaschromatographischer Trennmethoden, Dissertation, UHG Essen, 1999
- Krupp, E.M., Grümping, R., Furchtbar, U.R.R., Hirner, A.V., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354, 546-549,
- Lambertson, L., Lundberg, E., Nilsson, M., Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 1296-1301, 2001
- Leibnitz, E., Struppe, H.G., *Handbuch der Gaschromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1970



- Lespes, G., Carlier-Pinasseau, C., Astruc, M., *Environ. Tech.*, 18, 1179-1186, 1997
- Lobinski, R., *Spectrochim. Acta B*, 53, 177-185, 1998
- Martin, F.M., Donard, O.F.X., *Fresenius J. Anal. Chem*, 351, 230-236, 1995
- Mason, R.P., Benoit, J.M., In: Craig, P.J (Hrsg.), *Organometallic compounds in the environment*, John Wiley and Sons, Chichester, 2003
- Michalke, K., Meyer, J., Hirner, A.V., Hensel, R., *Appl. Organometal. Chem.*, 16, 221-227, 2002
- Michalke, K., Wickenheiser, E.B., Mehring, M., Hirner, A.V., Hensel, R., *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2791, 2000
- Montes-Bayon, M., Grant, T.D., Meija, J., Caruso, J.A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, 1015-1023, 2002
- National Research Council Report, *Arsenic in drinking water*, National Academic Press, Washington DC, 2003
- Ohno, H., Suzuki, M., Nakashima, S., Aoyama, T., Mitani, K., *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 43, 208-214, 2002
- Palmieri, Y., *Bull. Bismuth Inst.*, Sonderbeilage, 1993
- Pavageau, M.P., Pecheyran, C., Krupp, E.M., Morin, A., Donard, O.F.X., *Environ. Sci. Technol.*, 36, 1561-1573, 2002
- Ponomarev, D.A., Golovin, A.V., Takhistov, V.V., *Eur. J. Mass Spectrom.*, 8, 409-434, 2002
- Prange, A., Jantzen, E., *J. Anal. At. Spectrom.*, 10, 105-109, 1995
- Rapsomanikis, S., Weber, J.H., In: Craig, P.J. (Hrsg.), *Organometallic compounds in the environment*, Longman, Harlow, 1986
- Roudrigez-Gonzales, P., Encinar, J.R., Alonso J.I.G., Sanz-Medel, A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, 824-830, 2002
- Schomburg, G., *Gaschromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1977
- Schröder, E., *Massenspektrometrie, Begriffe und Definitionen*, Springer, Berlin, 1991
- Schwarz, A., Heumann, K.G., *Anal. Bioanal. Chem.*, 374, 212-219, 2002

Seifert, J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 66, 366, 1939

Slikkenveer, A., de Wollf, F.A., *Med. Toxicol. Adverse Drug Exp.*, 4, 303,

Smith, L.M., Maher, W.A., Craig, P.J., Jenkins, R.O., *Appl. Organometal. Chem.*, 16, 287-293, 2002

Snell, J.P., Stewart, I.I., Sturgeon, R.E., Frech, W., *J. Anal. At. Spektrom.*, 15, 1540-1545, 2000

Stevenson, D.P., *Dicuss. Faraday Soc.*, 10, 35-45, 1951

Szpunar, J., Bouyssiere, B., Lobinski, R., In: Caruso, J.A., Sutton, K.L., Ackley, K.L. (Hrsg.), *Comprehensive analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2000

Tsunoi, S., Matoba, T., Shioji, H., Giang, L., Harino, H., Tanaka, M., *J. Chromatogr. A.*, 962, 197-206, 2002

Tu, Q., Qian, J., Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, 1583-1588, 2000

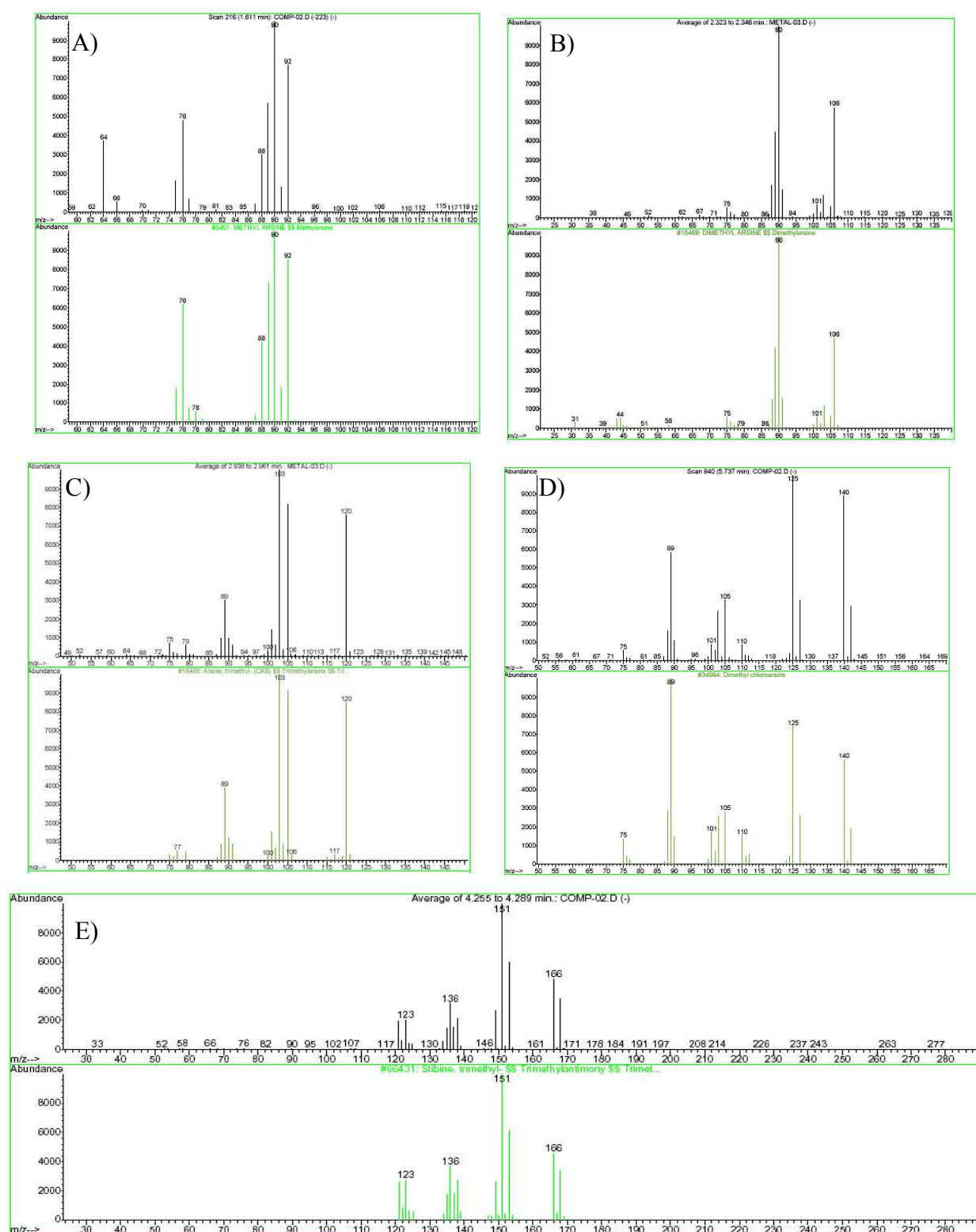
Valenzuela, O.L., Borja-Aburto, V.H., Garcia-Vargas, G.G., Cruz-Gonzales, M., Garcia-Montalvo, E.A., Calderon-Aranda, E.S., Del Razo L.M., *Environ. Health Perspec.*, 113, 250-254, 2005

Van Deemter, J.J., Zuiderweg F.J. Klinkenberg, A., *Chem. Eng. Sci.*, 5, 271-289, 1956

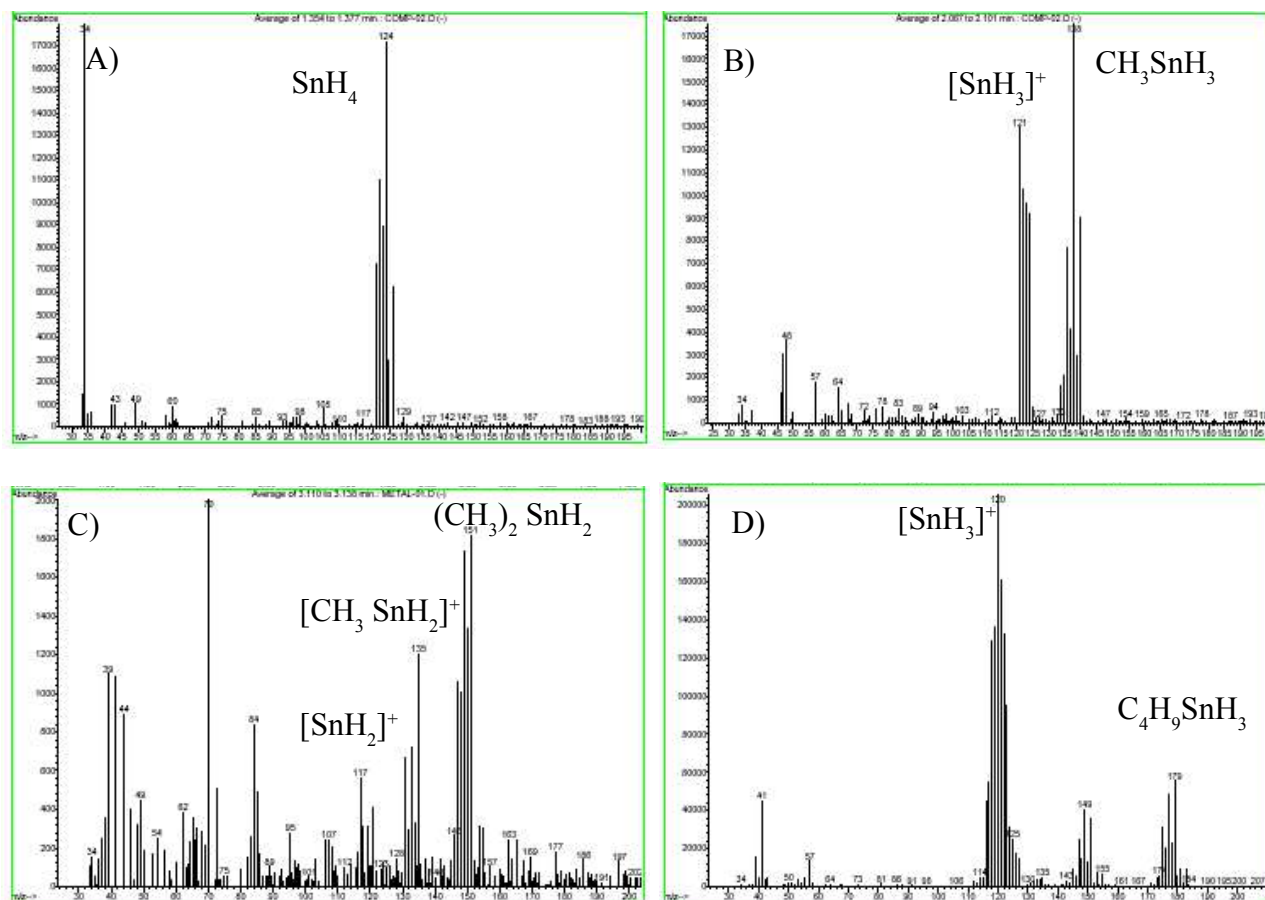
Vather, M., *Appl. Organomet. Chem.*, 8, 175-182, 1994

Weber, J.H., *Mar. Chem.*, 65, 67, 1999

## 8 Anhang



**Abbildung 8.1: Massenspektren mit Vergleichsspektren aus der Bibliothek (Wiley 7n.1) von A) Monomethylarsin, B) Dimethylarsin C) Trimethylarsen, D) Dimethylchlorarsen E) Trimethylantimon. Die Spektren aus den Realproben sind jeweils oben und die Bibliotheksspektren unten dargestellt.**



**Abbildung 8.2: Massenspektren von A) Stanan, B) Monomethylzinnhydrid, C) Dimethylzinnhydrid, D) Monbutylzinnhydrid**

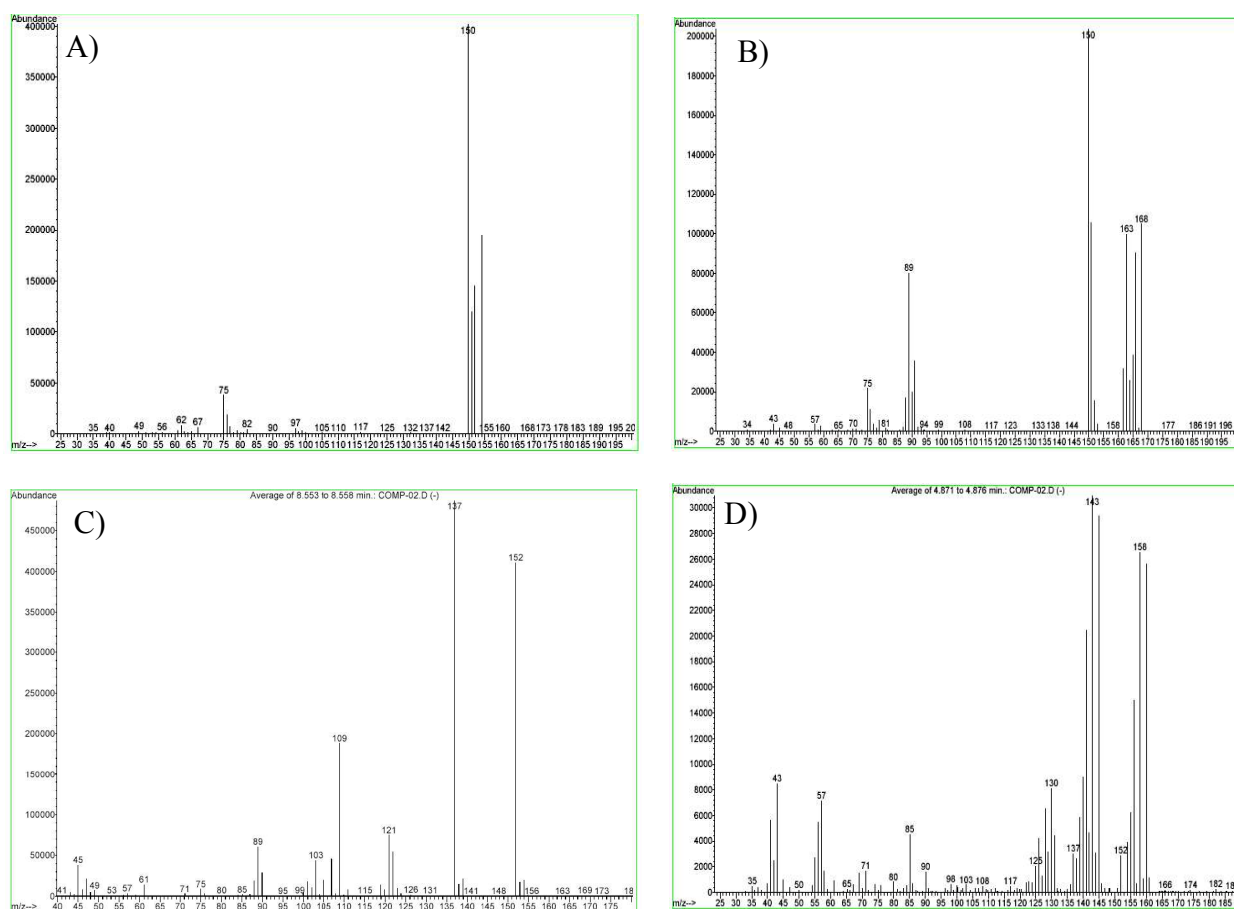
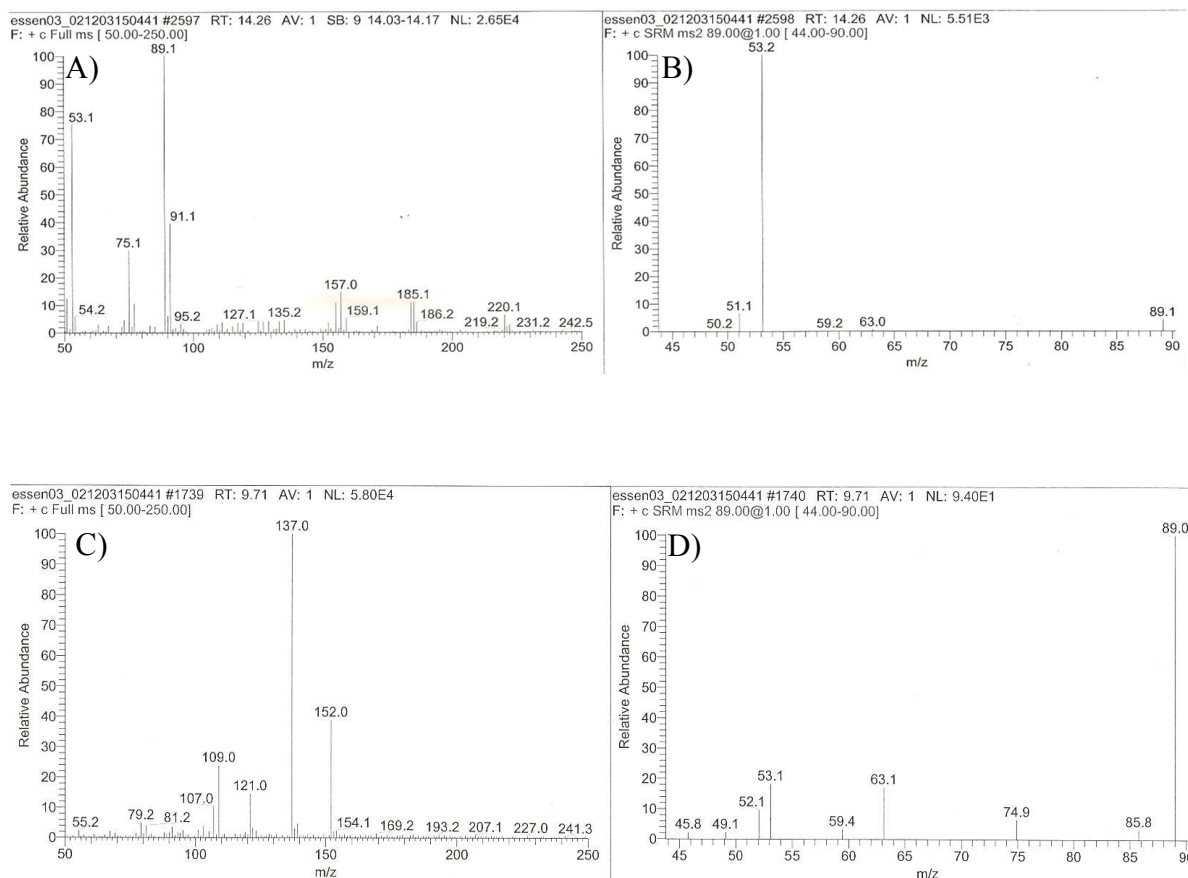
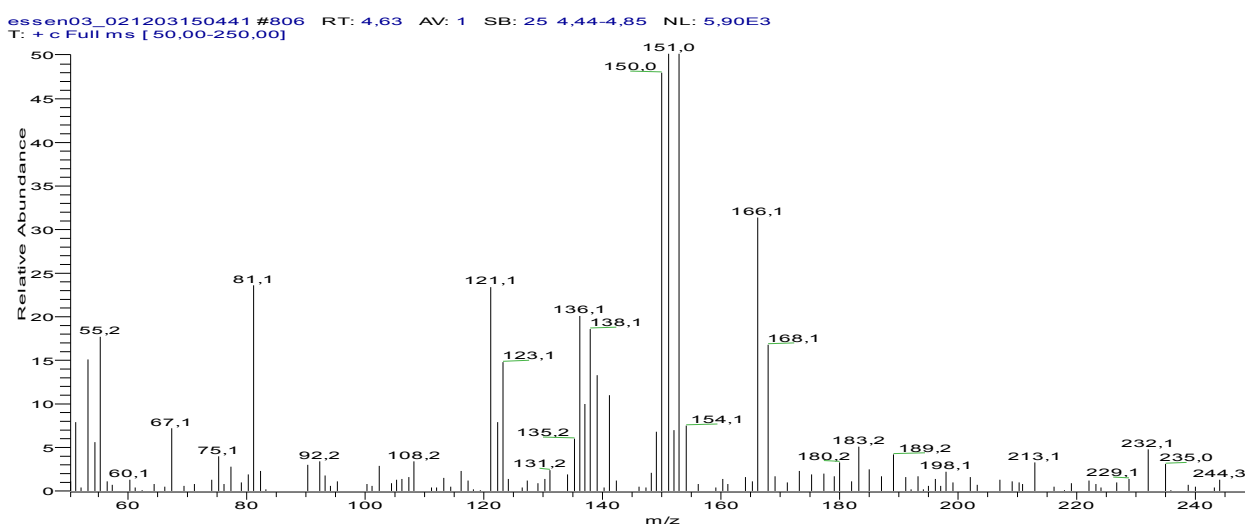


Abbildung 8.3: Massenspektren von A) Diarsin, B) Methylarsin, C) Dimethylmethylthioarsen, D) Dimethyltellur. [Kösters et al. 2003]



**Abbildung 8.4:** Für die Masse 89 bei RT 14.26 Min ( A ) und die Masse 137 bei RT 9.71 Min ( C ) wurde mit dem PolarisQ (Thermo Finigan) jeweils ein zweites Fragmentogramm erzeugt (MS<sup>2</sup>) ( B ) und D ) )



**Abbildung 8.5:** MS Spektrum von Trimethylantimon aus der Messung einer Kompostprobe mit dem PolarisQ (Thermo Finigan)

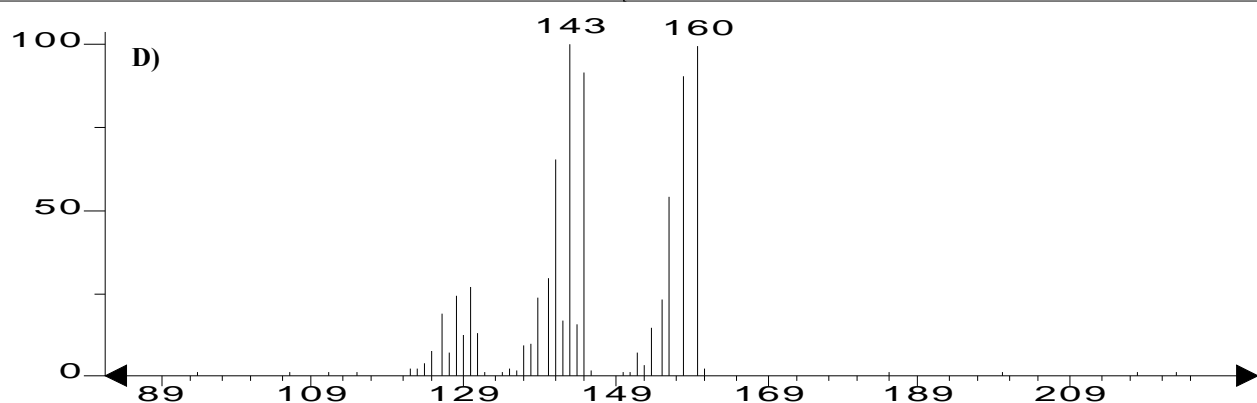
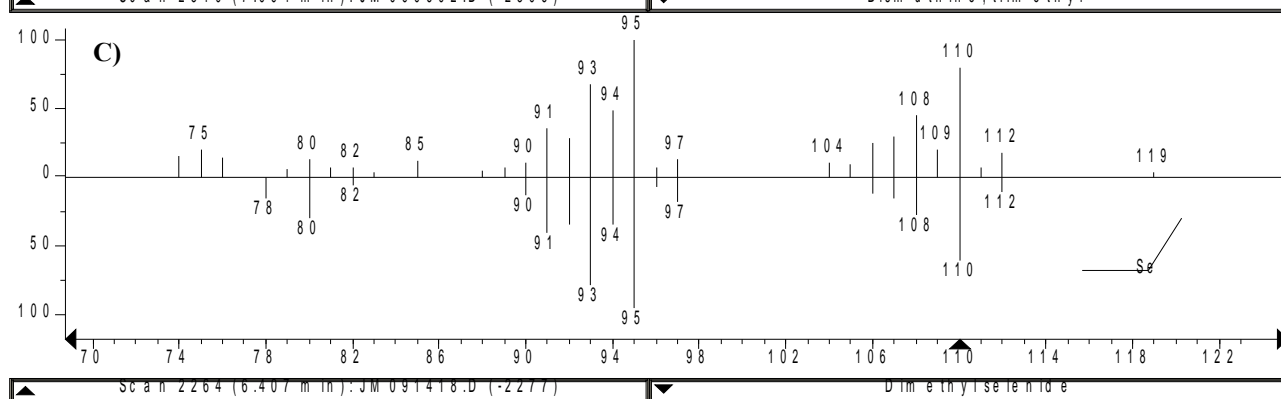
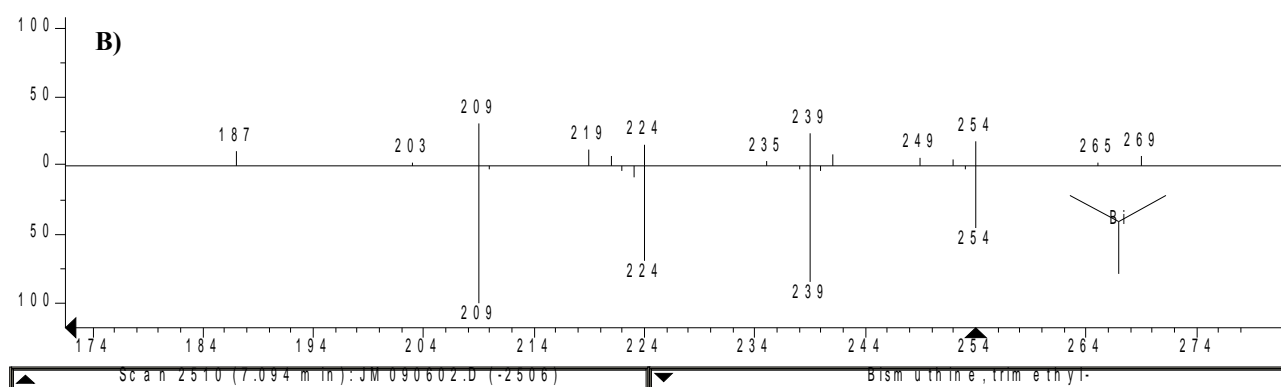
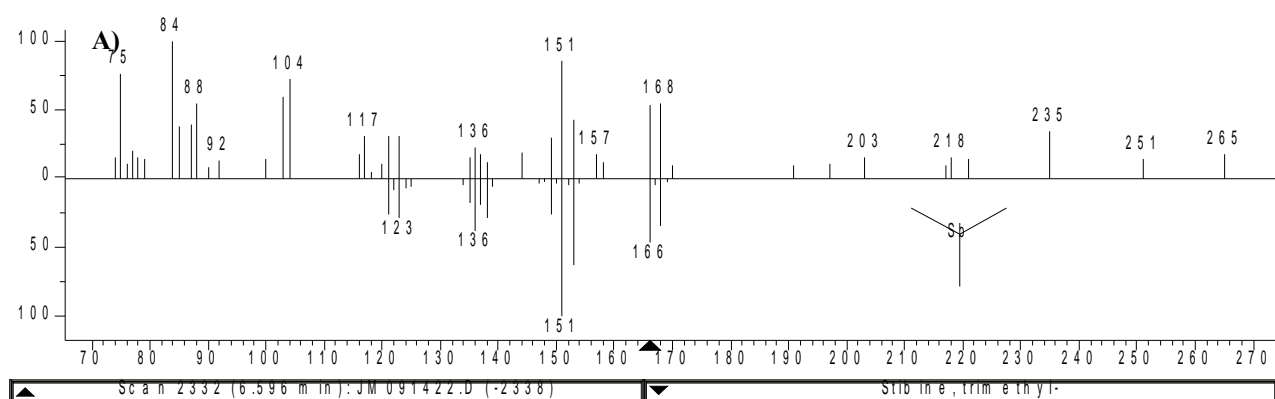


Abbildung 8.6: Massenspektren von A) TMBi, B) TMSb, C) DMSe mit Bibliotheksspektren sowie D) DMTe aus den Headspace Untersuchungen verschiedener Archaeenarten.

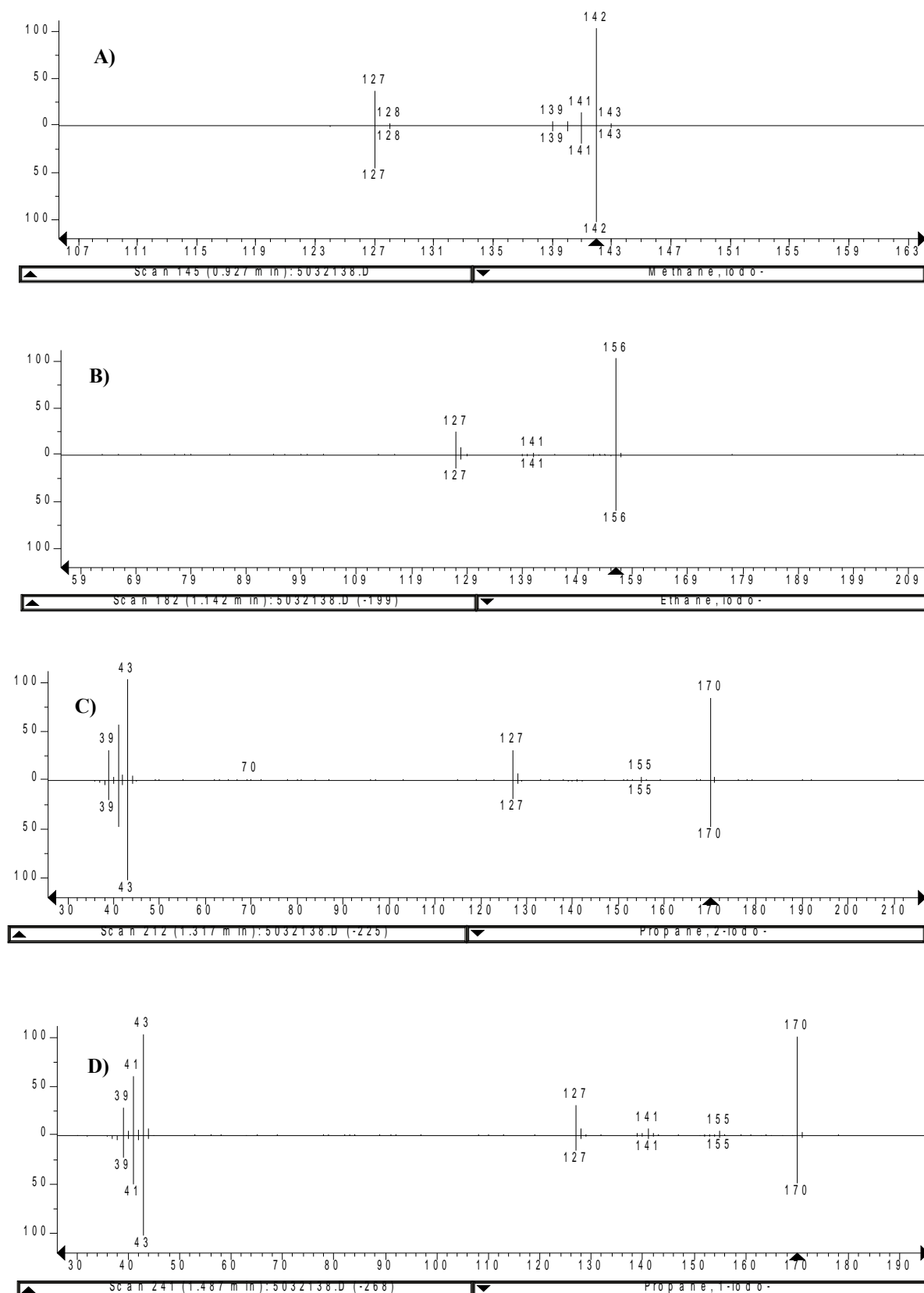


Abbildung 8.7: Massen- und Bibliotheksspektren (head to tail) der untersuchten Iodalkane.  
A) Iodmethan, B) Iodethan, C) 2-Iodopropan und D) 1-Iodopropan



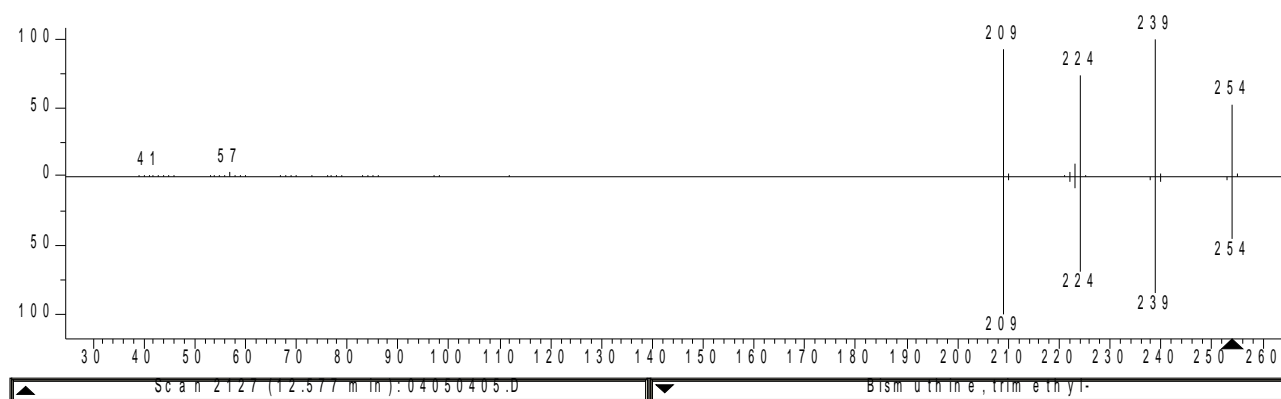


Abbildung 8.8: Massenspektrum und Datenbankvergleich für TMBi

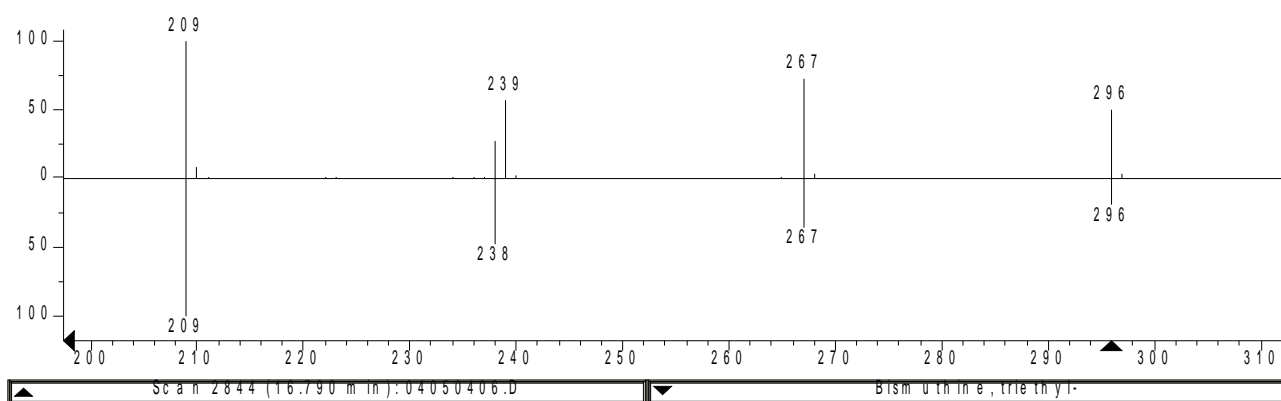


Abbildung 8.9: Massenspektrum und Datenbankvergleich für TEBi

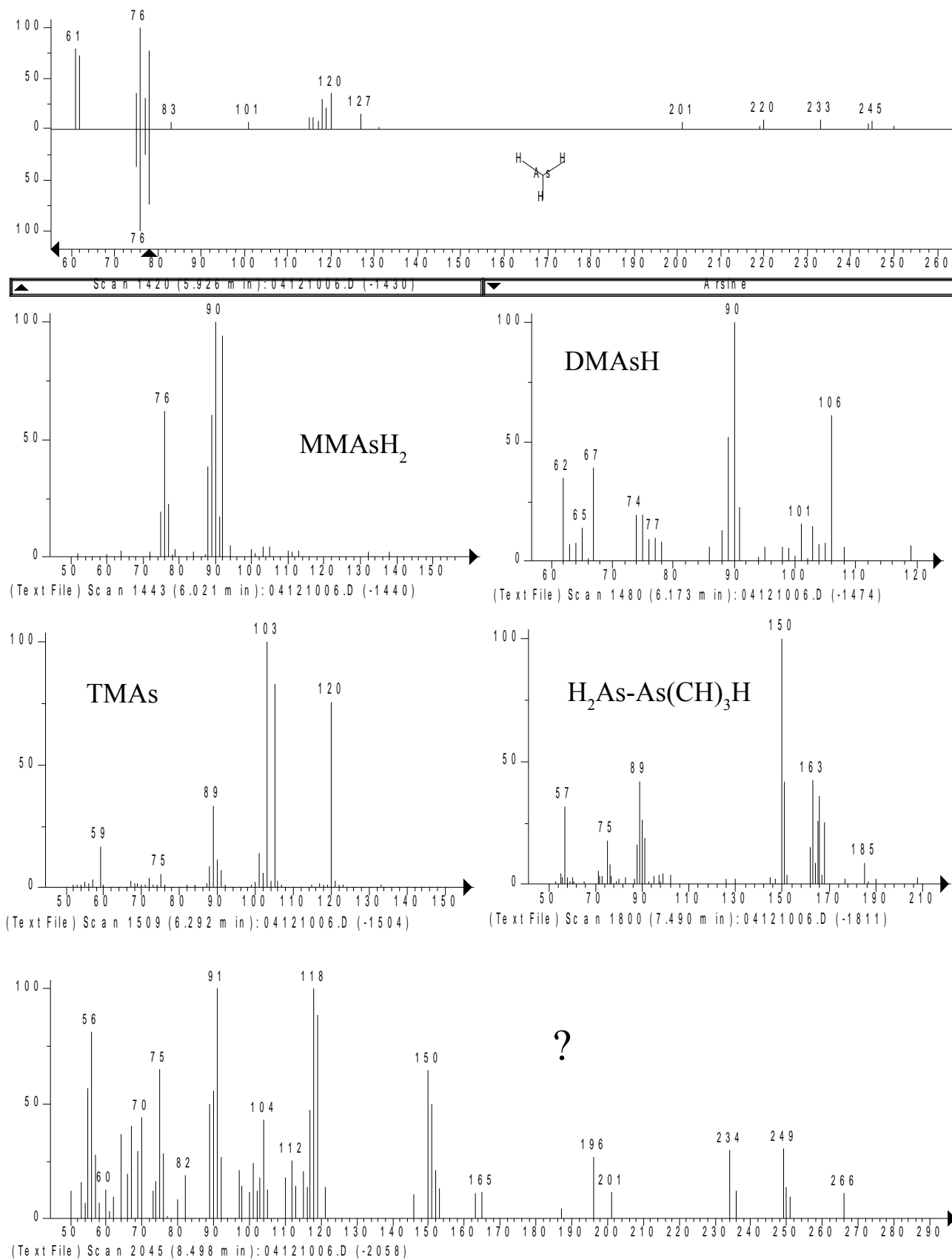
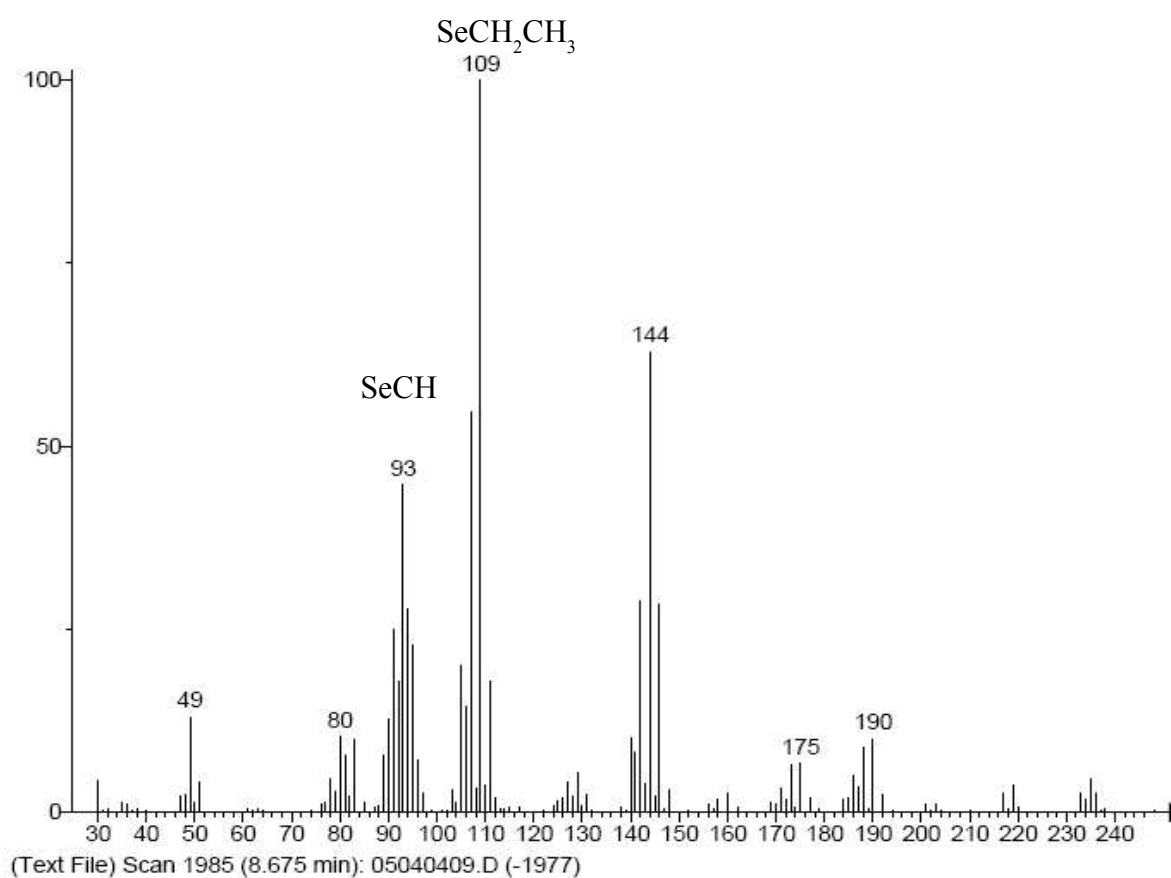
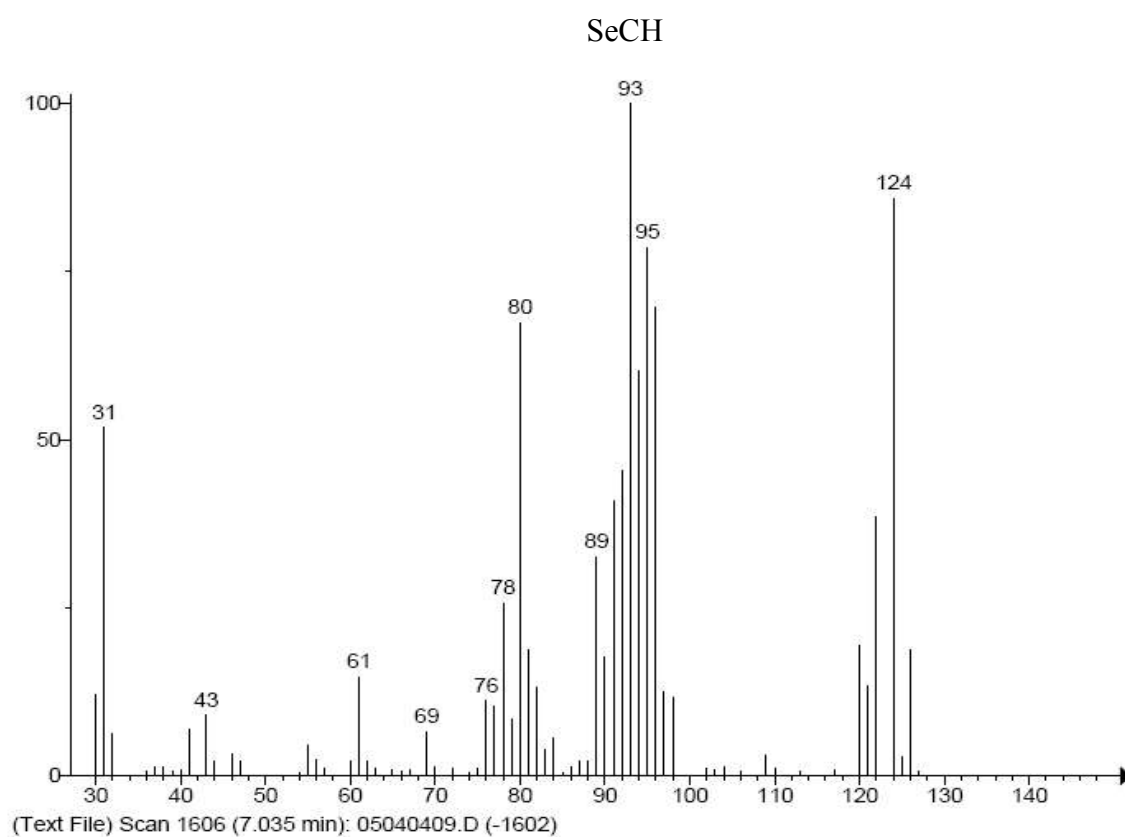


Abbildung 8.10: Massenspektren der in Abb. 4.12 (S.108) gezeigten Arsenspezies



**Abbildung 8.11: EI-Massenspektren nicht zugeordneter Selenspezies nach Photolyse von Dimethylselen (Abb. 4.17 S. 116) bei RT 7,04 Min und 8,68 Min.**

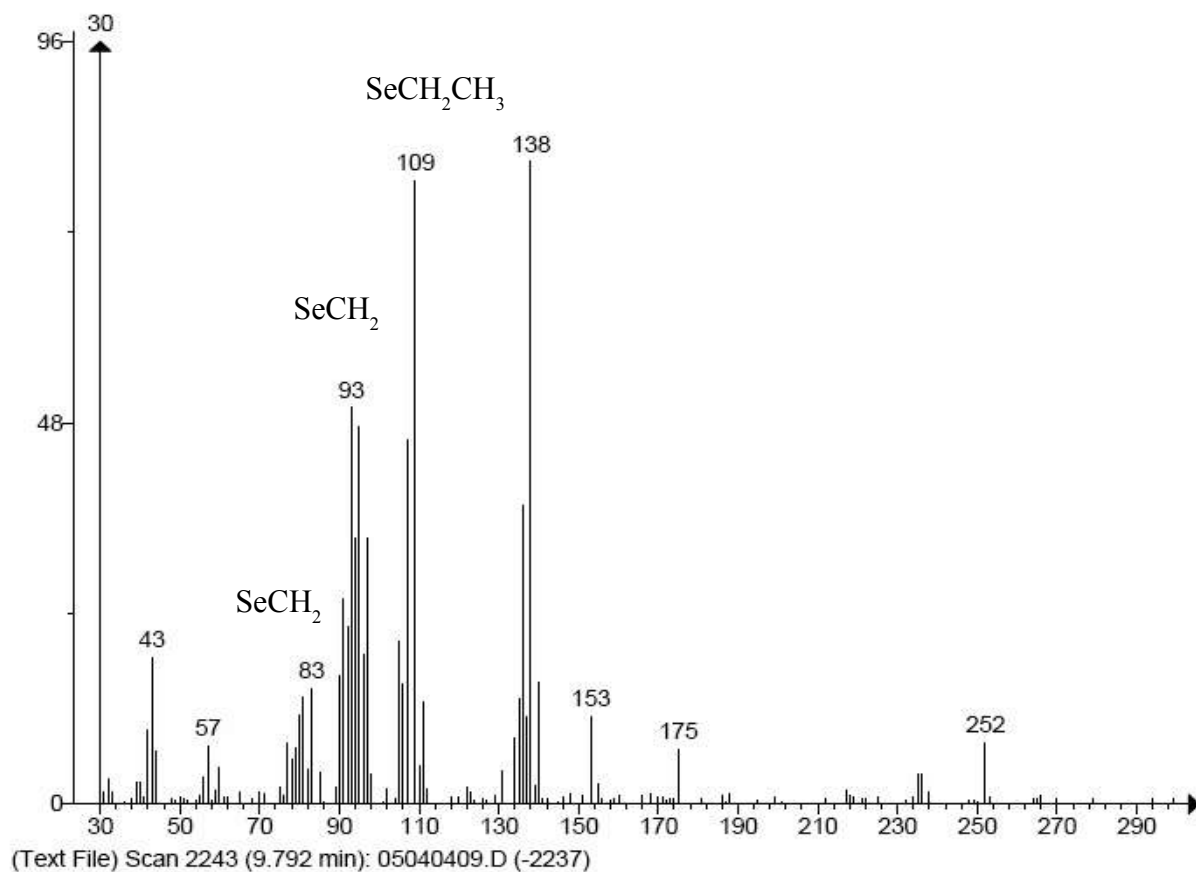
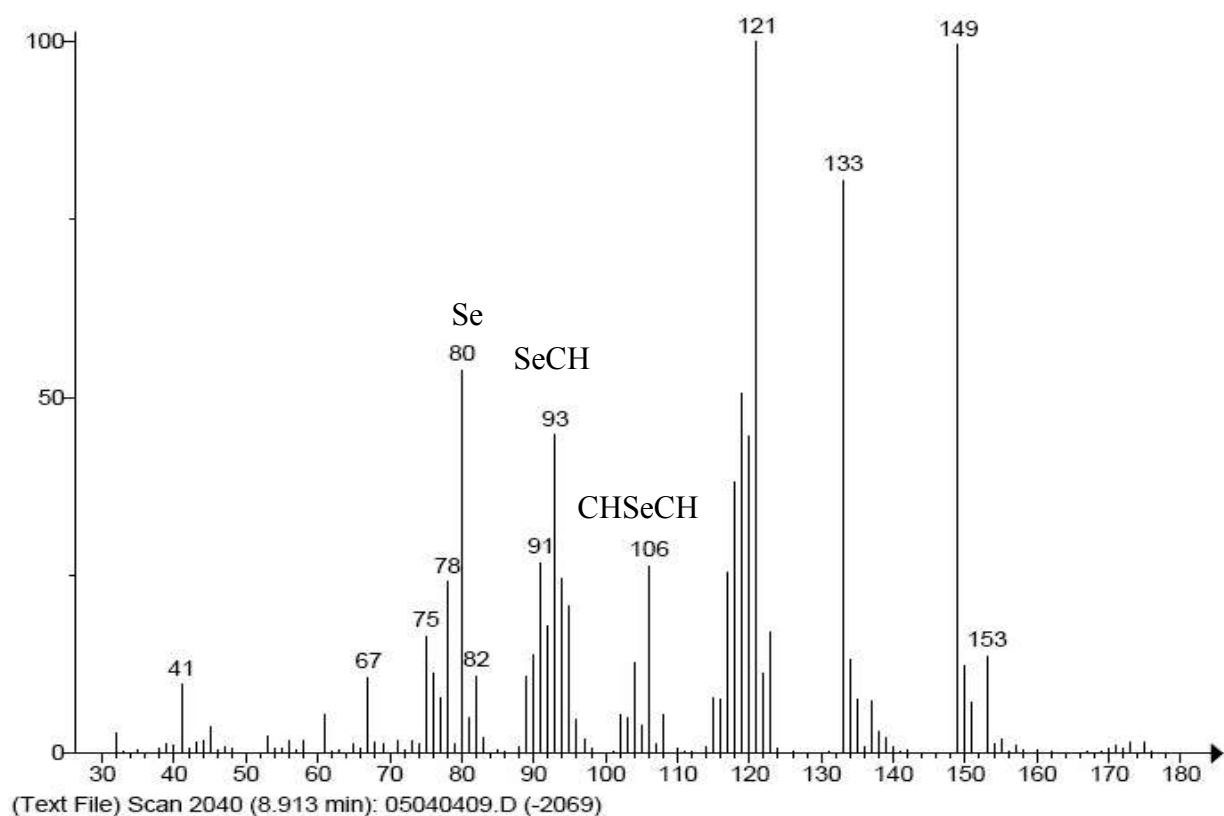
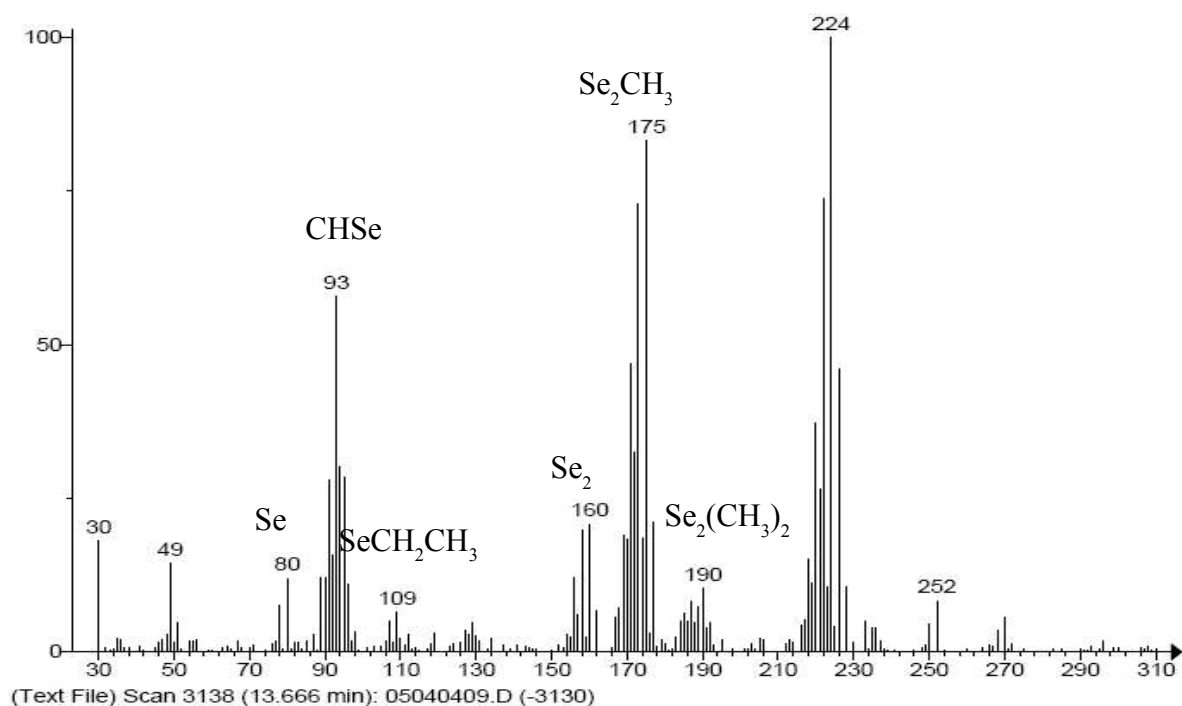
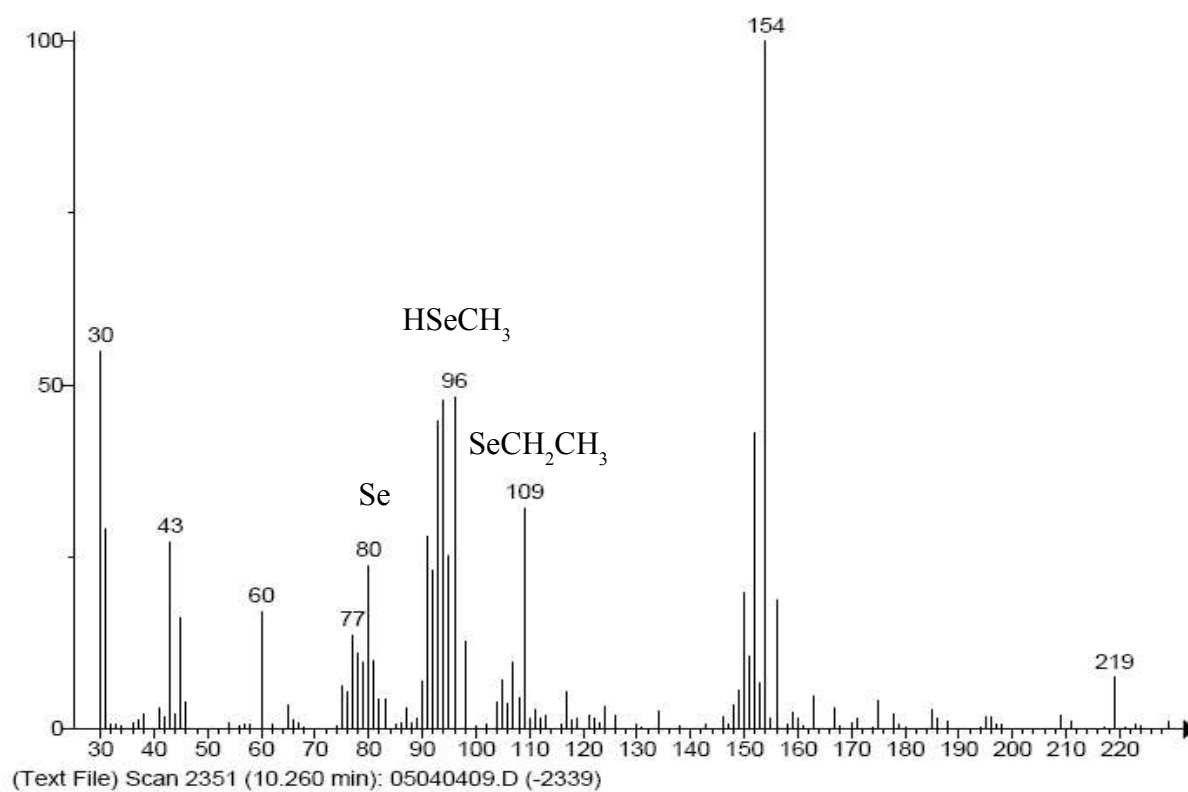
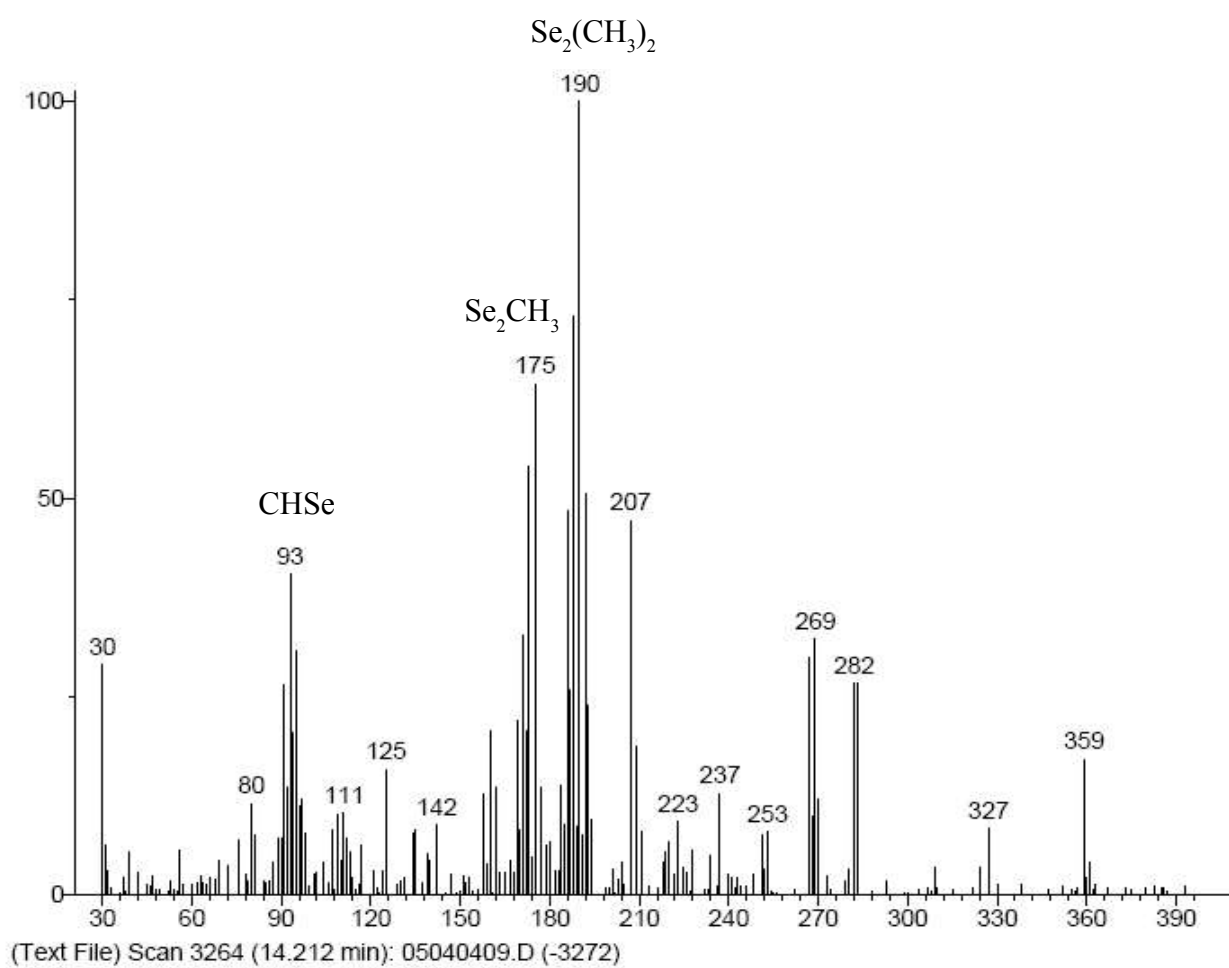


Abbildung 8.12: EI-Massenspektren nicht zugeordneter Selenspezies nach Photolyse von Dimethylselen (Abb. 4.17 S. 116) bei RT 8,91 Min und 9,79 Min.



**Abbildung 8.13: EI-Massenspektren nicht zugeordneter Selenspezies nach Photolyse von Dimethylselen (Abb. 4.17 S. 116) bei RT 10,26 Min und 13,66 Min.**



**Abbildung 8.14:** EI-Massenspektrum nicht zugeordneter Selenspezies nach Photolyse von Dimethylselen (Abb. 4.17 S. 116) bei RT 14,21 Min.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. A.V. Hirner für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit sowie bei Herrn P.D. Dr. Kai Bester für die Übernahme des Koreferats.

Stellvertretend für alle Mitarbeiter des Institutes für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen, die zum Gelingen und zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben möchte ich Jörg Hippler und Roland A. Diaz-Bone, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, für ihre Unterstützung danken.

Nicht unerwähnt sollen an dieser Stelle meine Eltern und meine Familie bleiben, denen mein Dank schon allein deshalb gilt, weil sie mir den Weg bis hierhin ermöglicht haben und mir durch ihr Vertrauen stets die notwendige Kraft gegeben haben meine Ziele standhaft zu verfolgen.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch an meine Freundin (und zukünftige Frau) Mirjana richten; für ihr Verständnis, wenn das knappe Gut gemeinsamer Zeit mal wieder geteilt werden musste aber auch für die notwendige Ablenkung in den schöpferischen Pausen, welche mir über so manche kreative Durststrecke hinweg geholfen hat.





## Erklärung

Hiermit erkläre ich, gemäß § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich für die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Desweiteren erkläre ich, dass ich keine anderen Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Fachbereich Chemie in dem Institut für Umweltanalytik und angewandte Geochemie durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 01.09.2006

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. F.G. Klärner

1. Gutachter: Prof.Dr. A.V. Hirner

2. Gutachter: PD Dr. K. Bester

Essen,

Jan Kösters



## Publikationsliste:

- [1] Kösters, J., Diaz-Bone, R.A., Planer-Friedrich, B., Rothweiler, B., Hirner, A.V., Identification of organic arsenic, tin, antimony and tellurium compounds in environmental samples by GC-MS, J. Mol. Struc. 661-662, 347-356, 2003  
präsentiert auf dem 6. Symposium Massenspektrometrische Verfahren der Elementspurenanalyse und 18. ICP-MS Anwendertreffen, 06.-09. Okt. 2003, Berlin
- [2] Hirner, A.V., Hartmann, L. M., Hippler, J., Kresimon, J., Kösters, J., Michalke, K., Sulkowski M., Rettenmeier, A.W., Organometal(oid) compounds associated with human metabolism. In: Hirner, A.V. und Emons, H. (Hrsg.), Organic metal and metalloid species in the environment, Springer-Verlag, Berlin, 2004
- [3] Kösters, J., Hippler, J., Diaz-Bone, R.A., Hirner, A.V., Parallel ICP-MS and EI-MS detection after GC separation as a unique tool for simultaneous identification and quantification of volatile heteroatomic organic compounds, J. Anal. At. Spectrom., 20, 996 – 999, 2005  
präsentiert auf der European Winter Conference on Plasma Spectrometry, 30. 01. - 02.02, 2005, Budapest
- [4] L. Düster, R.A. Diaz-Bone, Jan Kösters, A.V. Hirner, Methylated arsenic-, antimony-, and tin species in soils, J. Environ. Mon., 7, 1186-1193, 2005
- [5] Diaz-Bone RA, Hasenäcker F, Rabieh S, Kösters J, Hirner AV (in Vorbereitung)  
Investigation of methylated trivalent arsenic species in urine by a combined liquid and gas chromatographic approach



---

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name, Vorname: Kösters, Jan

Geburtsdatum: 29.02.1976

Geburtsort: Bocholt

Anschrift: Alt Wormbach 4, 57392 Schmallenberg

## Schulische Ausbildung

1982-1986 Diepenbrockschule in Bocholt

1986-1995 Besuch des St. Georg - Gymnasiums in Bocholt (Abschluß: Abitur)

## Akademische Ausbildung

10/1996 – 07/2002 Diplom Chemie an der Universität-Gesamthochschule Essen.

08/2001: Hauptdiplomprüfungen

07/2002: Diplom Chemiker

09/2002 - 04/2006 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Umwelt-analytik und angewandte Geochemie der Universität Duisburg-Essen

09/2006 Disputation

## Berufliche Laufbahn

Seit 11/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (Fraunhofer IME)  
Abteilung Umweltprobenbank und Elementanalytik